

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

CYTOTOXICITÉ DU CADMIUM, DU PLOMB ET DU MERCURE
ET CARACTÉRISATION DU TRANSPORT MEMBRANAIRE
DE CADMIUM DANS LES CELLULES ALVÉOLAIRES (A549)
ET BRONCHIOLAIRES (H441)

MÉMOIRE

PRÉSENTÉ

COMME EXIGENCE PARTIELLE

DE LA MAÎTRISE EN BIOLOGIE

PAR

LOUBNA EL IDRISSE

JUIN 2009

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

REMERCIEMENTS

En préambule à ce mémoire, je souhaite adresser ici tous mes remerciements aux personnes qui m'ont apportée leur aide et qui ont ainsi contribué à l'élaboration de ce mémoire.

Tout d'abord je tiens à remercier ma directrice de recherche, Mme Catherine Jumarie, pour sa sympathie, son aide, sa disponibilité et le temps qu'elle a bien voulu me consacrer et sans qui ce mémoire n'aurait jamais vu le jour.

Je remercie également mes collègues, Marc, Guillaume et Pascale pour leur gentillesse et formidable esprit d'équipe.

J'adresse aussi mes plus sincères remerciements à mes parents et à mon mari Tarik qui m'ont toujours supportée, soutenue et encouragée au cours de la réalisation de ce mémoire.

Enfin, un grand merci à ma petite fille chérie Dina pour sa patience envers une "maman étudiante".

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES	vi
LISTE DES TABLEAUX ET ÉQUATIONS	viii
LISTE DES ABRÉVIATIONS	x
RÉSUMÉ.....	xii
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE I	
LES MÉTAUX LOURDS DANS L'ENVIRONNEMENT	3
1.1 Caractéristiques.....	3
1.2 Émissions naturelles et anthropiques	4
1.3 Persistance et dispersion	4
1.4 Métaux lourds préoccupants pour la santé.....	5
1.4.1 Cadmium	5
1.4.2 Plomb.....	6
1.4.3 Mercure.....	7
CHAPITRE II	
ABSORPTION ET TOXICITÉ DU CADMIUM, DU PLOMB ET DU MERCURE.....	8
2.1 Absorption et toxicité.....	8
2.1.1 Cadmium	8
2.1.2 Plomb.....	10
2.1.3 Mercure.....	12
2.2 Spéciation.....	13
2.3 Transport membranaire	14
2.4 Interactions entre métaux	15
CHAPITRE III	
L'APPAREIL RESPIRATOIRE	18
3.1 Voies supérieures et bronchioles.....	19
3.2 Les alvéoles pulmonaires	20
3.3 Dépôt de particules atmosphériques.....	23
3.4 Système immunitaire alvéolaire.....	24
3.5 Toxicité des particules et métaux.....	25

3.6 Vulnérabilité pulmonaire aux métaux lourds	26
CHAPITRE IV	
LIGNÉES CELLULAIRES	28
4.1 La lignée A549	28
4.2 La lignée H441	30
CHAPITRE V	
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	31
5.1 Objectifs et hypothèses de recherche	31
CHAPITRE VI	
MATÉRIELS ET MÉTHODES	33
6.1 Culture cellulaire	33
6.2 Transport membranaire et accumulation cellulaire de ^{109}Cd et de ^{45}Ca	34
6.3 Dosage de protéines	36
6.4 Test de viabilité : MTT	37
6.5 Cytométrie de flux (FACS)	38
6.6 Analyses statistiques des résultats	39
6.6.1 Accumulation cellulaire en fonction du temps	40
6.6.2 Détermination des paramètres cinétiques de transport	40
6.6.3 Analyse de la viabilité cellulaire	41
CHAPITRE VII	
RÉSULTATS	43
7.1 Cytotoxicité du Cd, du Pb et du Hg	43
7.1.1 Cytotoxicité du Cd et accumulation du ^{109}Cd	43
7.1.2 Cytotoxicité du Hg et Pb	44
7.1.3 Cytométrie de flux (FACS)	45
7.2 Caractérisation du transport membranaire du Cd	45
7.2.1 Accumulation temporelle du ^{109}Cd	45
7.2.2 Paramètres cinétiques du transport de ^{109}Cd	46
7.2.3 Accumulation de ^{109}Cd en fonction de la spéciation et du pH	47
7.2.4 Interaction Cd-Ca	48
7.3 Interactions Cd-métaux toxiques	49
7.4 Liste des tableaux	52

7.5 Liste des figures	54
CHAPITRE VIII	
DISCUSSION	65
8.1 Cytotoxicité et accumulation du ^{109}Cd	65
8.2 Cytotoxicité du Hg et Pb	66
8.3 Accumulation temporelle du ^{109}Cd	68
8.4 Paramètres cinétiques de transport du Cd	68
8.5 L'effet du pH et de la spéciation organique et inorganique	69
8.6 Interaction Cd-Ca :	71
8.7 Interaction Cd-Hg et Cd-Pb	72
CHAPITRE IX	
CONCLUSION	74
RÉFÉRENCES	76

LISTE DES FIGURES

Figure	Titre	Page
1.1	Relation-dose effet d'éléments essentiels et non essentiels.	4
3.1	Schéma montrant les deux poumons enveloppés par les deux feuillets de la plèvre et entourés par les côtes et le diaphragme.	19
3.2	Schéma représentant les voies aérophores intrapulmonaires au niveau du poumon gauche.	20
3.3	Schéma montrant le rapport entre bronchioles terminales, bronchioles respiratoires, canaux alvéolaires, sacs alvéolaires et alvéoles.	21
3.4	Sacs alvéolaires en microscopie électronique s'ouvrant dans deux alvéoles.	21
3.5	Pneumocyte de type II en microscopie électronique à balayage.	22
3.6	Pénétration des particules dans l'appareil respiratoire.	24
4.1	Image en microscopie à fluorescence de cellules A549.	29
4.2	Image en microscopie à fluorescence de cellules H441.	30
7.1	Viabilité cellulaire en fonction de concentrations croissantes de Cd, de Pb et de Hg dans les cellules A549 et H441.	53
7.2	Accumulation (24h) de 0.3 μM ^{109}Cd dans les cellules A549 et H441.	54
7.3	Viabilité cellulaire en présence de Cd mesurée par la méthode de cytométrie de flux (FACS) dans les cellules A549.	54
7.4	Accumulation temporelle de ^{109}Cd dans les cellules A549 et H441.	55
7.5	Détermination des paramètres cinétiques du transport de ^{109}Cd en fonction de la spéciation inorganique dans les cellules A549 et H441.	56
7.6	Accumulation de ^{109}Cd en fonction de la spéciation organique et	57

inorganique et en fonction du pH dans les cellules A549 et H441.

7.7	Accumulation de ^{109}Cd en conditions basales et dépolarisantes dans les cellules A549 et H441.	58
7.8	Accumulation de ^{45}Ca en conditions basales et dépolarisantes dans les cellules A549 et H441.	59
7.9	Viabilité cellulaire en présence de Cd, de Pb et de Hg (utilisés à leurs valeurs de LC_{50}) seuls, pris deux à deux ou en combinaison multiple dans les cellules A549 et H441.	60
7.10	Viabilité cellulaire en fonction de concentrations croissantes de Cd en absence et en présence de Hg et de Pb dans les cellules A549 et H441.	61
7.11	Viabilité cellulaire en fonction de concentrations croissantes de Hg en absence et en présence de Cd et de Pb dans les cellules A549 et H441.	62
7.12	Accumulation (24 h) de $0.3\ \mu\text{M}$ ^{109}Cd en absence et en présence de Pb et de Hg (utilisé à leur valeur de LC_{50}) dans les cellules A549 et H441.	63

LISTE DES TABLEAUX ET ÉQUATIONS

Tableau	Titre	Page
6.1	Spéciation du Cd en milieu chlorure et nitrate.	36
7.1	Paramètres de toxicité du Cd à des concentrations variant de 0 à 800 μM dans les cellules A549 et de 0 à 1000 μM dans la lignée H441.	51
7.2	Paramètres de toxicité du Hg à des concentrations variant de 0 à 500 μM dans les cellules A549 et H441.	51
7.3	Viabilité cellulaire en présence de Cd (15, 60 et 120 μM) mesurée en utilisant l'essai MTT et la méthode de cytométrie de flux (FACS).	51
7.4	Paramètres d'accumulation maximale (A_{max}) et initiale (A_0) du ^{109}Cd dans les cellules A549 et H441 en absence et en présence de 100 μM de Cd non radioactif.	52
7.5	Paramètres cinétiques de l'accumulation initiale (3 min) de ^{109}Cd (K_m , V_{max} et K_d) en fonction de la spéciation inorganique.	52
7.6	Paramètres de toxicité du Cd en présence de Hg et de Pb et paramètres de toxicité du Hg en présence de Cd et de Pb dans les cellules A549.	52
7.7	Paramètres de toxicité du Cd en présence de Hg et de Pb et paramètres de toxicité du Hg en présence de Cd et de Pb dans les cellules H441.	52

Équation		Page
6.1	Mono-exponentielle croissante	40
	$A = A_0 + A_{\max} (1 - e^{-kt})$	
6.2	Michaelis-Menten modifiée	40
	$v = \frac{V_{\max} T}{K_m + T + S} + K_d T$	
6.3	Courbe dose-réponse semi-logarithmique de viabilité cellulaire	41
	$y = y_{\min} + \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + 10^{(\log LC50 - X) \cdot Hillslope}}$	

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADN	Acide désoxyribonucléique
Ca	Calcium
Cd	Cadmium
CdO	Oxyde de cadmium
CdS	Sulfate de cadmium
LC ₅₀	Concentration létale pour 50% de cellules
Cu	Cuivre
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
EDTA	Acide éthylène-diamine-tetraacétique
FACS	Cytométrie de flux
FBS	Sérum bovin fœtal (Fetal bovine serum)
Fe	Fer
FETAX	Étude de la tératogenèse sur des embryons de grenouille (The Frog Embryo Teratogenesis Assay)
GSH	Glutathion
HEPES	Acide 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonique
Hg	Mercure
HSP70	Protéine de choc thermique (Heat-shock protein)
Mg	Magnesium
MT	Métallothioneine
MTT	Bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl- tétrazolium

Nramp-2	Protéine 2 du macrophage associée à la résistance naturelle (Natural resistance associated macrophage protein 2)
Pb	Plomb
PbO	Oxyde de plomb
pH	Potentiel d'hydrogène
ROS	Espèces réactives de l'oxygène (Reactive oxygen species)
VDCC	Canaux calciques dépendants du voltage (Voltage dependant calcium channel)
Zn	Zinc

RÉSUMÉ

Le cadmium (Cd), métal extrêmement toxique, peut pénétrer dans l'organisme par ingestion, mais également par inhalation. Le mécanisme régissant son transport membranaire est jusqu'ici inconnu mais sa nature toxique suggère qu'il puisse emprunter des systèmes de transports dédiés à certains éléments essentiels tels que le calcium (Ca). Notre étude évalue la cytotoxicité du Cd, du Pb et du Hg utilisés seuls ou en combinaisons multiples dans deux lignées cellulaires humaines A549 et H441 qui représentent respectivement le phénotype de cellules alvéolaires et bronchiolaires de l'épithélium pulmonaire. La caractérisation du transport de Cd selon la spéciation organique et inorganique et selon le pH est aussi étudiée tout en vérifiant l'implication possible des voies calciques. L'essai MTT indique que le Cd et Hg sont cytotoxiques dans les deux lignées alors que le Pb ne semble pas affecter la viabilité cellulaire. Les résultats démontrent aussi que la lignée A549, pour laquelle la plus faible valeur de LC_{50} a été mesurée, est deux fois plus sensible au Cd que la lignée H441 (60 μ M vs 120 μ M). L'étude de l'accumulation du ^{109}Cd montre que la variation de cette sensibilité ne peut être attribuée à une accumulation supérieure de Cd. Dans les deux lignées, les résultats de toxicité et d'accumulation du Cd en présence de Hg et de Pb indiquent la présence d'une corrélation entre les contenus cellulaires en Cd et le potentiel toxique. Il semble que le Pb protège les deux lignées contre la toxicité du Cd en inhibant le transport membranaire du Cd alors que le Hg sensibilise les cellules A549 en augmentant les niveaux d'accumulation du Cd. La caractérisation du transport membranaire de ^{109}Cd montre une inhibition de l'accumulation temporelle du ^{109}Cd dans un milieu chloré en présence d'un excès de Cd non radioactif ce qui indique l'implication d'un système spécifique de transport. Les paramètres d'accumulation et les caractéristiques cinétiques varient d'une lignée à l'autre et révèlent la présence d'un processus saturable et à haute affinité ($K_m < 5 \mu\text{M}$ dans les deux cas). L'accumulation de Cd est supérieure en milieux inorganiques (chloré et nitré) comparativement au milieu organique (DMEM) probablement suite à la complexation du Cd. Nos résultats montrent aussi une plus grande variation du transport de Cd en fonction du pH dans la lignée A549; le Cd étant bien moins transporté à pH acide. L'étude des interactions Cd-Ca montre que le Ca n'inhibe pas le transport du ^{109}Cd mais que le Cd inhibe le transport de ^{45}Ca . Dans les cellules A549, un transport de ^{45}Ca dépendant du voltage et hautement sensible à une inhibition par le Cd a aussi pu être mis en évidence. En conclusion, l'accumulation pulmonaire de Cd n'implique pas de voies de transport calciques et varie selon le phénotype cellulaire et les interactions avec d'autres métaux. La toxicité du Cd n'est pas toujours corrélée aux niveaux d'accumulation du métal et dépendrait d'autres mécanismes cellulaires qui réduisent la toxicité du Cd et diffèrent d'une lignée à l'autre. Nous émettons donc l'hypothèse que des mécanismes de protection cellulaire (GSH, MT et HSP70) seraient probablement responsables des variations de sensibilité observées dans les cellules A549 et H441.

Mots clés : Métaux lourds (Cd, Pb et Hg), cellules A549 et H441, transport membranaire, viabilité cellulaire, canaux calciques dépendants du voltage.

INTRODUCTION

Les métaux lourds sont naturellement présents mais en quantités très faibles dans les sols, l'eau et l'air et ne sont pas biodégradables. Ils s'introduisent dans l'environnement de diverses façons : extraction minière, utilisation de combustibles fossiles, comme le charbon, combustion de déchets, feux de forêt, fumée de cigarette. Certains métaux sont indispensables aux organismes vivants, d'autres, par contre, ne sont pas essentiels. La toxicité de certains de ces métaux non essentiels, dont le cadmium (Cd), le plomb (Pb), et le mercure (Hg), est reconnue, même à de très faibles concentrations. Cette toxicité est renforcée par un phénomène de concentration dans l'organisme qu'on appelle bioaccumulation. Dans plusieurs études menées sur des travailleurs, l'exposition aux métaux lourds dans l'air a été associée à une augmentation de la mortalité causée par le cancer du poumon (CIRC, 2006). De plus, les effets toxiques des métaux sont amplifiés chez les gros fumeurs à cause d'effets de potentialisation entre la fumée de cigarette inhalée et les métaux lourds provenant du secteur d'activité (Byrd *et al.*, 1989; Perriot *et al.*, 2003). Une fois absorbés, ces métaux sont souvent difficiles à éliminer et la demi-vie de la plupart d'entre eux dans le corps humain est plutôt longue: elle est d'environ 30 ans pour le Cd (Feillet *et al.*, 2002).

Les métaux peuvent pénétrer dans l'organisme par ingestion mais également par inhalation (Miquel, 2001). Même si l'absorption intestinale du Cd représente la principale voie d'entrée pour les organismes vivants, la biodisponibilité du Cd inhalé est supérieure à celle du Cd ingéré. En effet, pendant sa vie professionnelle, un sujet ventile entre 25 et 100 x 10³ m³ d'air sur son lieu de travail. De ce fait, il est évident qu'un polluant, même présent à de faibles concentrations, peut entraîner des lésions de l'appareil respiratoire (Martinet, 1999).

Ce projet vise donc à caractériser l'accumulation de métaux lourds dans les cellules pulmonaires en utilisant deux lignées cellulaires représentant deux phénotypes différents afin de mieux évaluer le potentiel toxique que présentent les métaux sur la santé pulmonaire. Il

s'agit de la lignée A549 et H441. Nous avons évalué la toxicité de trois métaux représentant une menace pour la santé, soient : le Cd, le Pb et le Hg. Par la suite nous avons caractérisé le transport membranaire du Cd afin de bien comprendre comment ce métal est accumulé dans les deux lignées cellulaires utilisées.

Les quatre premiers chapitres de ce mémoire justifient l'intérêt et la nécessité d'étudier la toxicité et le transport membranaire des métaux choisis. Tout d'abord on expliquera l'utilisation et la présence environnementale de métaux lourds (chapitre I), puis on détaillera bien leurs effets sur la santé (chapitre II). Par la suite, il sera question de décrire l'appareil respiratoire, expliquant la vulnérabilité pulmonaire aux toxiques inhalés (chapitre III) et de présenter les lignées cellulaires utilisées (chapitre IV). Après avoir posé nos hypothèses et objectifs (chapitre V) et détaillé les techniques utilisées (chapitre VI), nous présenterons les résultats obtenus qui seront analysés (chapitre VII) et discutés à la lumière des travaux antérieurs et des hypothèses soulevées (chapitre VIII) avant de tirer des conclusions (chapitre IX) de notre recherche.

CHAPITRE I

LES MÉTAUX LOURDS DANS L'ENVIRONNEMENT

1.1 Caractéristiques

Les métaux lourds sont les éléments métalliques naturels dont la masse volumique dépasse 5g/cm³ et qui possèdent un numéro atomique élevé. Ils sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en quantités très faibles et ne sont pas biodégradables. On dit que les métaux sont présents en « quantités traces » car ils représentent 0,6 % (en masse) du total des constituants de la croûte terrestre (Blum, 1990) et représentent aussi « la trace » du passé géologique et de l'activité anthropique.

Le terme de métal lourd est souvent appliqué à tort à des éléments en raison de leur toxicité. En effet, certains métaux toxiques sont déclarés métaux lourds alors qu'ils sont des métalloïdes (arsenic). De plus, il existe des métaux lourds qui sont indispensables aux organismes vivants; d'autres, par contre, ne sont pas essentiels. La toxicité de certains des métaux non essentiels est reconnue, même à de très faibles concentrations (Cd, Pb, Hg) (Blum, 1990), alors que les métaux essentiels (calcium (Ca), zinc (Zn), cuivre (Cu)) peuvent également devenir dangereux dès que leur concentration dans l'organisme dépasse un certain seuil (Baize, 1997). La relation-dose effet d'éléments essentiels et non essentiels est présentée dans la figure 1.1.

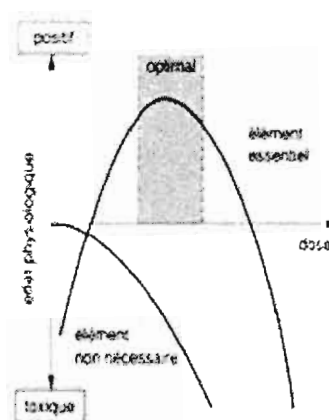


Figure 1.1 Relation-dose effet d'éléments essentiels et non essentiels

1.2 Émissions naturelles et anthropiques

Si la plupart des métaux sont présents naturellement à l'état de trace dans le fond géochimique (sols, eau), des quantités plus ou moins importantes s'introduisent dans l'environnement par émissions naturelles (érosion, émissions volcaniques, feux de forêts) ou anthropiques (extraction minière, combustion de combustibles fossiles, utilisation de pesticides et engrais).

À l'échelle mondiale, les émissions d'origine anthropique dépassent dorénavant les émissions d'origine naturelle pour bon nombre d'éléments tels que le Pb, le Cd, le Zn, l'arsenic et le Hg. Une fois en circulation, ces métaux se distribuent dans tous les compartiments de la biosphère : terre, air et eau (Gombert, 2005).

1.3 Persistance et dispersion

L'activité humaine n'a apporté aucun changement dans les volumes de métaux lourds. Il n'y a ni création, ni suppression. Elle a surtout changé la répartition des métaux, les formes chimiques (ou spéciation) et les concentrations par l'introduction de nouveaux modes de dispersion (fumées, égouts, voitures...). Si une partie des métaux lourds part directement dans

le sol et les eaux, l'essentiel est d'abord émis dans l'atmosphère avant de rejoindre les deux autres compartiments. Le compartiment atmosphérique joue un rôle important dans la dispersion des métaux. Dans l'atmosphère, la plupart des éléments métalliques se trouvent associés à des aérosols, c'est-à-dire à des particules liquides et/ou solides en suspension dans l'air. Ces particules sont transportées avec un temps de résidence plus au moins long avant de retomber au sol. La taille, la forme et la composition chimique des particules influencent fortement leur dispersion et leur durée de séjour dans l'atmosphère (Bliefert et Perraud, 2004).

1.4 Métaux lourds préoccupants pour la santé

Parmi les métaux lourds, on distingue principalement trois d'entre eux : le Hg, le Pb et le Cd. Pourquoi distinguer ces trois métaux ? Les biochimistes ont distingué ces trois métaux en raison de leur affinité avec le soufre. Les sels solubles de Pb, de Hg et de Cd, ajoutés à une préparation de protéines en solution conduisent à la formation de précipités volumineux et très denses dus à une combinaison solide entre les fonctions soufrées de ces protéines et ces ions métalliques (Florkin, 1956).

Les trois métaux ont aussi quelques caractéristiques physico-chimiques communes : ils ont une conductivité électrique élevée, ce qui explique leur utilisation dans de nombreuses industries; ils sont tous des éléments toxiques qui n'accomplissent aucune fonction physiologique utile chez l'homme et ont la capacité de s'accumuler dans la chaîne alimentaire.

1.4.1 Cadmium

Le Cd est un métal blanc argenté ayant des propriétés physiques proches de celles du Zn (Sarkar *et al.*, 2002). On rencontre en général le Cd à l'état de sulfure et il est souvent présent comme impureté dans le minerai de Zn appelé sphalérite (Lymburner, 1974). Le Cd

est utilisé dans la fabrication des piles (nickel-Cd), dans la préparation par galvanisation de couches protectrices de fer (Fe) bien malléables mais résistantes à la corrosion ainsi que dans les composés d'alliages. De plus, on utilise les composés de Cd comme pigments de peintures résistants à de hautes températures (Bliefert et Perraud, 2004).

Dans l'environnement, le Cd provient pour la plus grande partie des usines élaborant ou traitant les métaux et des unités d'incinération de déchets. Il parvient dans le sol par le processus de déposition par les engrais qui en contiennent et par les boues d'épuration. Il parvient dans les eaux avant tout par dépôt à partir de l'air, mais aussi par les eaux de précipitation et par l'eau de ruissellement de décharges d'ordures.

1.4.2 Plomb

L'utilisation du Pb a traversé les âges depuis la haute antiquité en dépit de sa toxicité déjà décrite deux siècles avant JC par Nicander (Grandjean, 1975). Des travaux archéologiques récents ont mis en évidence des sites de production à partir de la galène (PbS) en Asie centrale datant d'environ 6 500 ans avant notre ère (Wittmers *et al.*, 2002) et le développement d'une chimie du Pb en Égypte ancienne vers 3 000 avant JC essentiellement liée à l'élaboration de cosmétiques (Walter *et al.*, 1999). Des récipients datés approximativement à 1 000 avant JC ont été mis à jour en Chine. En Europe, l'exploitation minière du gisement de Laurion en Grèce qui fut la plus importante de l'antiquité, a débuté vers 850 avant JC (Wittmers *et al.*, 2002). La Rome antique a fait grand usage de ce métal et de ses alliages pour manufacturer une multitude d'objets de la vie courante comprenant des ustensiles de cuisine, des jarres, des coffres et des canalisations. (Greenwood et Earnshaw, 1984).

Le Pb peut constituer des alliages avec de nombreux autres métaux. Il peut facilement être extrait de minerais (Bliefert et Perraud, 2004). L'utilisation presque universelle de composés du Pb pour les raccords et les soudures effectués dans les réseaux de distribution d'eau a des répercussions importantes sur la qualité de l'eau potable. Au Canada, il se peut

que les réseaux de distribution et la plomberie installés avant 1945 soient faits de tuyaux en Pb (Quinn, 1990). Les déchets solides et liquides (boues) constituent environ 81% des rejets de Pb effectués dans l'environnement, habituellement dans des décharges. Mais ce sont les émissions atmosphériques qui sont responsables de la dispersion du Pb dans l'ensemble de l'environnement (Bliefert et Perraud, 2004). Le Pb est un des principaux polluants métalliques de l'atmosphère. Dans l'air, il forme une couche d'oxyde de Pb qui le protège contre la corrosion. L'introduction de l'essence sans Pb a grandement fait diminuer ce type d'émission.

1.4.3 Mercure

Le Hg est un métal de forte densité et de couleur blanc argent et dont le point de fusion est situé à -39°C . Il est le seul métal liquide à température ambiante (25°C). Il est présent dans l'écorce terrestre à la teneur moyenne de 0,08 mg/kg. Son principal minerai est le cinabre (sulfure de Hg : HgS) (Friberg et Vostal 1972). On utilise le Hg et ses composés pour la fabrication de thermomètres, de tubes fluorescents et de lampes à rayonnement ultraviolet et comme fongicide dans les peintures et les eaux de traitement industriel.

Un grand nombre de composés du Hg sont volatils et la plupart se décomposent pour former de la vapeur de Hg, bien que certains se subliment sans décomposition. Le Hg peut diffuser dans l'atmosphère par simple déplacement à l'état de vapeur de Hg métallique ou de composés organomercurels volatilisés. Ceux-ci proviennent de l'activité métabolique microbienne, animale ou végétale. Ces processus naturels entretiennent une circulation constante de quantités appréciables de Hg dans l'environnement atmosphérique.

CHAPITRE II

ABSORPTION ET TOXICITÉ DU CADMIUM, DU PLOMB ET DU MERCURE

Le Cd, le Pb et le Hg sont des éléments métalliques extrêmement toxiques. Il s'agit d'éléments non essentiels au développement des organismes, animaux ou végétaux, et qui peuvent nuire au métabolisme cellulaire. Les voies de contamination pour l'humain sont l'inhalation, l'ingestion et l'exposition cutanée. Ces métaux toxiques sont responsables de bons nombres de maladies. Leur toxicité est reconnue, même à de très faibles concentrations et peut être attribuée à des interactions inappropriées avec différentes structures intracellulaires. Cette toxicité est renforcée par un phénomène de concentration dans l'organisme qu'on appelle bioaccumulation (Roesijadi, 1994).

2.1 Absorption et toxicité

2.1.1 Cadmium

L'alimentation est la principale source d'apport du Cd dans la population générale non professionnellement exposée au Cd et non fumeuse. Les légumes et les céréales sont les sources principales de Cd, bien que le Cd soit également trouvé dans la viande mais à degré moindre. Le Cd s'accumule en particulier dans le rein et le foie, par conséquent les abats contiennent des concentrations relativement élevées. Le poisson contient seulement de petites quantités de Cd alors que les crustacés et les mollusques peuvent accumuler de plus grandes quantités (Bliefert et Perraud, 2004).

Plusieurs études ont montré que, chez l'humain, l'intestin absorbe de 4 à 7% d'une dose unique de Cd ingérée (Kitamura *et al.*, 1970; Rahola *et al.*, 1971). Le taux d'absorption du nitrate de Cd ou du chlorure de Cd mesuré sur des animaux de laboratoire varie de 0,5 à 3% (Friberg *et al.*, 1974). Au cours d'une autre étude, on a ajouté du Cd à l'eau servie à des rats qui ont retenu moins de 1% de la quantité ingérée pendant des mois (Decker *et al.*, 1958). De même, les niveaux d'accumulation de Cd dans les cultures de cellules de l'épithélium intestinal sont aussi faibles (Jumarie *et al.*, 1997; Pigman *et al.*, 1997).

Bien que l'ingestion représente une voie d'absorption du Cd, la biodisponibilité pulmonaire de ce métal semble être plus importante. Cependant, on ne connaît pas les facteurs qui déterminent le dépôt du Cd dans les poumons et son absorption par inhalation. Quoique peu de données quantitatives aient été publiées, on estime qu'environ 25% des composés solubles du Cd inhalés sont absorbés (OMS, 1974). Cette proportion varie considérablement selon la taille des particules inhalées et la solubilité des composés du Cd. Analysant six différentes marques de cigarettes, Nandi *et al.* (1969) ont trouvé des taux de Cd variant entre 19 et 27 µg/20 cigarettes. Il semble que l'absorption du Cd par inhalation de la fumée de cigarette soit importante (25 à 50%) (Fleischer *et al.*, 1974; Nordbeg, 1974; Bernard et Lawyers, 1988). En effet, on a observé qu'une partie de Cd présent dans le tabac se trouve dans la fumée (Nandi *et al.*, 1969; Pappas *et al.*, 2007). Il a été estimé que le fait de fumer 20 cigarettes par jour augmentait la concentration systémique de 1.2 à 7 fois celle mesurée chez un individu non-fumeur ayant le même apport de Cd via les autres sources (Nilsson *et al.*, 1995). Il n'est dès lors pas étonnant que les fumeurs accumulent plus de Cd dans les reins, le foie et les poumons que les non fumeurs (Lewis *et al.*, 1972; Hammer *et al.*, 1973). On a d'ailleurs suggéré que le Cd serait en partie responsable de l'action toxique de la fumée de tabac sur les poumons (Snider *et al.*, 1973) et que les sujets décédés de bronchite chronique ou d'emphysème ont plus de Cd stocké dans le foie que les sujets décédés d'autres causes (Lewis *et al.*, 1969).

En milieu professionnel, l'inhalation est sans doute la voie principale d'absorption du Cd bien que l'ingestion puisse jouer un rôle non négligeable quand les travailleurs ne respectent pas les règles d'hygiène (manger et fumer avec les mains contaminées) (Roels *et*

al., 1982). Chez l'humain, on a signalé de nombreux cas d'intoxication aiguë à la suite d'inhalation de concentrations élevées de Cd ou de fumées d'oxyde de cadmium (CdO) ou de sulfate de Cd (CdS) pendant la fusion ou la coulée du Cd (OMS, 1974). On estime que la mortalité, dans les cas d'intoxication sévère par les fumées de CdO, survient à 15-20% dans les 3 jours suivant l'exposition (Fernandez *et al.*, 1996). Il a aussi été démontré que l'exposition chronique au Cd est associée au développement de fibrose, de pneumonie, du cancer du poumon et d'emphysème pulmonaire chez l'humain (Bonnel, 1955; Leduc *et al.*, 1993; Chambers *et al.*, 1994; Fernandez *et al.*, 1996). L'emphysème est souvent accompagné de troubles rénaux incluant l'excrétion de protéines à faible poids moléculaire dans l'urine (Friberg *et al.*, 1974). L'inhalation de chlorure de Cd (CdCl₂) cause le cancer du poumon chez le rat (Takenaka *et al.*, 1993). Les cancers observés, surtout en milieu professionnel, touchent le tractus respiratoire (poumons, naso-pharynx) et éventuellement la prostate et le rein (Beton *et al.*, 1996). Étant un cancérogène reconnu chez l'homme (groupe I), le Cd est considéré comme l'un des métaux les plus préoccupants pour la santé humaine.

2.1.2 Plomb

Le Pb peut être absorbé par l'organisme par inhalation, ingestion, contact cutané (principalement lors d'une exposition professionnelle) (Moore *et al.*, 1980) et par transmission à travers le placenta (Angell *et al.*, 1982). Chez l'adulte, environ 10% du Pb ingéré est absorbé par l'organisme (USEPA, 1986). Une fois dans le sang, le métal est rapidement mobilisé à plus de 95 % par les érythrocytes puis distribué dans tous les organes mous. Il s'accumule ainsi dans le foie, les reins, le cerveau, le cœur et seuls 3% environ restent dans le plasma (Moore *et al.*, 1977). En absence de voie d'excrétion significative, il se dépose à raison de 90% dans les os sous la forme de phosphates insolubles où il s'insère dans le réseau cristallin de l'hydroxyapatite (Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂), le principal constituant du tissu osseux (Rabinowitz *et al.*, 1976; Moore *et al.*, 1977; Barry, 1978).

C'est d'abord l'existence d'intoxications massives chez les travailleurs professionnellement exposés au Pb qui a attiré l'attention sur ses effets délétères sur

l'organisme humain et sur ses conséquences neuropsychiques (Bradbury et Deane, 1993). La nocivité du Pb et de ses composés dépend en grande partie de la concentration, mais aussi de la solubilité du produit. Ses composés extrêmement nombreux sont à peu près tous toxiques (Mushak *et al.*, 1998). Les principaux produits nocifs du Pb sont : les oxydes de Pb (PbO); les sels de Pb qui sont le plus souvent colorés (chlorure ou jaune de Turner, antimoniate ou jaune de Naples, chromate ou jaune de chrome ainsi que d'autres sels tels que les arsénates ($\text{Pb}_3(\text{AsO}_4)_2$), les stéarates ($\text{Pb}(\text{C}_{17}\text{H}_{35}\text{COO})_2$) et les acétates ($\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$) qui sont employés en agriculture, en industrie chimique ou pharmaceutique (CIRC, 2006). Le PbO inhalé peut avoir des effets sur les macrophages pulmonaires. Des études ont montré que le nombre de macrophages pulmonaires était sévèrement réduit chez des rats inhalant du PbO en aérosols (Cohen *et al.*, 1995). D'autres formes communes de Pb sont les tétraéthyle et tétraméthyle. Ce sont des composés organiques de Pb hautement toxiques qui ont été largement utilisés comme additifs à essence, jusqu'à l'interdiction de leur utilisation aux Etats-Unis en 1986 puis dans l'Union européenne en l'an 2000 (Lincoln, 2005). Bien que ce type d'exposition ait grandement diminué, la toxicité chronique reste un problème majeur de santé publique partout dans le monde, affectant des millions d'enfants et d'adultes (Todd *et al.*, 1996; Bogden *et al.*, 1997). En milieu industrielle l'intoxication aiguë ne se rencontre que très rarement. Cependant, l'intoxication chronique peut toucher de nombreuses fonctions vitales (Boeckx, 1986).

Le Pb constitue par ailleurs un poison du système nerveux et peut provoquer des dommages irréversibles dans le développement de l'enfant (Boeckx, 1986). Cette neurotoxicité est due à la perturbation des mécanismes de libération de neurotransmetteurs, régulés par le Ca (Godwin, 2001). Les conséquences sont surtout marquées au cours de deux périodes critiques : la petite enfance car l'absorption de Pb est beaucoup plus importante qu'à l'âge adulte, et la vieillesse, car le Pb fixé dans les os est alors relargué dans le sang. Chez l'enfant, le Pb est à l'origine du saturnisme, maladie qui provoque des troubles de comportement avec un retard de développement mental et physique (Chanel *et al.*, 1999).

Un certain nombre d'études menées sur l'animal ont montré que l'exposition à des sels de Pb est capable d'induire le cancer (Azar *et al.*, 1973; Kobayashi et Okamoto, 1974; Poirier

et al., 1984; Koller *et al.*, 1986; Mikalsen, 1990; Waalkes *et al.*, 1995). En effet, des tumeurs rénales ont été induites chez des rats exposés par voie orale à des concentrations élevées de certains sels de Pb (Marcus, 1986). La cancérogénicité du Pb chez l'humain a fait l'objet de plusieurs études épidémiologiques portant sur l'exposition professionnelle (Kang, 1980). Une étude réalisée chez des personnes ayant travaillé pendant au moins un an dans une fonderie ou une fabrique de batteries concluait à une proportion plus élevée de décès par cancer de l'appareil respiratoire. Le Centre international de recherche sur le cancer considère que les données globales sur la cancérogénicité du Pb chez les humains sont insuffisantes (IARC, 1982).

2.1.3 Mercure

Le Hg est le seul métal qui demeure sous forme liquide à la température ambiante. Il peut facilement passer à l'état gazeux ou de vapeur ce qui lui permet de pénétrer dans l'organisme préférentiellement par les voies respiratoires (biodisponibilité pulmonaire de l'ordre de 80%) causant des dommages aux poumons : bronchites chroniques et bronchiolites avec pneumonies de type interstitielle (WHO, 1976). Sa légère liposolubilité lui permet de traverser facilement la barrière placentaire (Palkovicova *et al.*, 2007) ainsi que les alvéoles pulmonaires et de passer dans le sang grâce auquel il se répartit dans différents organes (Cercy et Wankmuller, 2008) où il est capable d'induire le stress oxydatif en affectant les niveaux intracellulaire de GSH réduit (Sener G *et al.*, 2007).

L'intoxication aiguë au Hg est exceptionnelle dans l'industrie. Elle peut survenir par inhalation de vapeurs de Hg en cas de contamination accidentelle d'espaces mal ventilés. Des études ont montré qu'après exposition aux vapeurs de Hg métallique, le cerveau accumule 10 fois plus de Hg que suite à l'administration intraveineuse d'une quantité similaire d'un sel de Hg (Berlin *et al.*, 1966; Nordbeg et Sereniu, 1969). D'autres études effectuées sur des rats (Schionning *et al.*, 1993) ainsi que sur l'humain (Cercy et Wankmuller, 2008) ont aussi montré une grande accumulation de Hg dans les neurones suite à une exposition aux vapeurs de Hg. L'inhalation répétée de vapeurs de Hg peut aussi engendrer des symptômes néphrotiques (Gaultier *et al.*, 1968 ; Foa *et al.*, 1976). Les symptômes respiratoires sont

surtout des frissons, de la fièvre, des douleurs thoraciques, de la toux, des nausées (Milne *et al.*, 1970; Lilis *et al.*, 1985). Une intoxication aiguë par voie orale est aussi possible. Cependant, le Hg est très peu toxique par ingestion car son absorption orale est très faible. Néanmoins, un grand nombre de composés de Hg ont été aussi utilisés comme pesticides pour le traitement des graines, notamment celles des céréales dans différents pays. Régulièrement des accidents liés à l'utilisation de ces graines dans la fabrication de farine et de pain a entraîné l'intoxication de populations en Irak en 1956, en 1960 et en 1972 et l'empoisonnement de plusieurs milliers de personnes ainsi que la mort de centaines. Des intoxications humaines similaires ont été enregistrées en 1961 au Pakistan et de 1963 à 1965 au Guatemala (Bakir, 1973).

2.2 Spéciation

La spéciation est la forme chimique sous laquelle se trouve un élément métallique. Les phénomènes chimiques qui contrôlent la spéciation sont la complexation, la chélation, la précipitation et l'adsorption. La complexation est la formation d'un complexe métallique dans lequel l'ion métallique est associé, par une liaison dite de coordination, avec un donneur d'électrons, appelé ligand, organique ou inorganique. La chélation est un complexe où un même ligand forme plusieurs liaisons de coordination. La complexation peut augmenter ou diminuer l'absorption de métaux (Goyer, 1991). Généralement, les ions métalliques libres sont la forme la plus toxique de métaux car ils sont très électrophiles (Leland *et al.*, 1985).

Les ions de métaux sont très réactifs et peuvent former des complexes avec un certain nombre de ligands ce qui change la propriété du métal, en particulier sa biodisponibilité et sa toxicité. Par exemple, le Cd peut former différents complexes avec des molécules inorganiques tels que le nitrate et le chlorure comme il peut se complexer avec d'autres ligands organiques tels que le GSH (Jumarie *et al.*, 2001). Différentes études ont montré que les formes organiques du Cd sont transportées moins rapidement que les formes inorganiques (Moberg, 1993; Berglund *et al.*, 1994) et que l'accumulation intestinale du Cd ne dépend pas seulement de la forme d'ion libre; des chlorocomplexes participent aussi au transport membranaire de Cd (Jumarie *et al.*, 2001). L'étude du transport du Hg à travers des

bicouches lipidiques artificielles indiquent aussi que comparativement aux formes ioniques, les chlorocomplexes de charge neutre (HgCl_2) traversent mieux les bicouches lipidiques (Gutknecht, 1981).

La toxicité d'un élément est donc directement liée à la spéciation. En effet, le taux d'absorption par le corps humain est souvent directement lié à la forme chimique et notamment à la solubilité de l'espèce chimique considérée (Pichard, 2000). Dans ce projet, l'attention est particulièrement portée sur l'impact de la spéciation sur l'accumulation cellulaire et la toxicité de métaux. Nous utilisons ainsi différents milieux afin de modifier la spéciation des métaux étudiés.

2.3 Transport membranaire

Au niveau cellulaire, la membrane plasmique forme la première barrière contre l'accumulation intracellulaire de différents toxiques. L'absorption des métaux implique un passage au travers d'un épithélium qui peut se faire par une diffusion simple ou par mécanismes de transport spécifiques (Schechter, 1990).

Le modèle de l'ion libre permet de décrire la biodisponibilité du Cd sur le principe (actuellement révisé) que la toxicité est directement proportionnelle à la concentration d'ion libre Cd^{2+} (Morel, 1983). Certains auteurs ont considéré que le processus d'entrée du Cd^{2+} à partir du milieu extracellulaire suivait le modèle de l'ion libre. En effet, le passage à travers la paroi gastro-intestinale est faible, de l'ordre de 4 à 7% et cette faible efficacité de transfert est associée à la présence de nombreux ligands dans le tractus digestif qui réduit la quantité relative de Cd^{2+} disponible (Kitamura *et al.*, 1970; Rahola *et al.*, 1971). Plus récemment, d'autres approches consistant à rigoureusement contrôler la spéciation dans les milieux d'incubation ont cependant permis de montrer que le Cd^{2+} n'est pas la seule espèce chimique à être transportée par des cellules intestinales en culture; des complexes organiques (Cd-GSH) ou inorganiques (CdCl_2) participeraient à l'accumulation cellulaire de Cd (Jumarie *et al.*, 2001).

Les systèmes d'accumulation cellulaire ne sont jamais totalement spécifiques à un élément donné et ils font l'objet d'une compétition entre espèces chimiques analogues de différents éléments, ce qui peut conduire à une inhibition de l'accumulation d'éléments essentiels au profit d'éléments potentiellement toxiques par mimétisme moléculaire. En effet, comme la présence de systèmes de transport spécifiquement dédiés aux métaux toxiques est improbable, il est généralement admis que les métaux non essentiels, comme le Cd, peuvent emprunter, par mimétisme ionique, le transport spécifique de métaux essentiels comme le Ca, le Fe ou le Zn (Luckey et Venugopal, 1977).

2.4 Interactions entre métaux

Les interactions entre les métaux peuvent avoir une grande influence sur l'absorption et la toxicité. Sundelin (1984) a fait une revue de la littérature concernant les interactions entre les métaux en terme d'accumulation et de toxicité: aucun schéma ne peut être généralisé puisque l'on observe des effets additifs aussi bien que synergiques et antagonistes. On peut seulement conclure que les effets observés dépendent de la combinaison de métaux employés, de la durée de l'exposition et de l'espèce (Forbes *et al.*, 1997).

Le Cd n'est pas un élément essentiel. En revanche, ses propriétés physiques et chimiques, proches de celles du Ca, lui permettent de traverser les barrières biologiques et de s'accumuler dans les tissus par mimétisme ionique avec le Ca. Le rayon du Cd^{2+} ($\text{Ca}^{2+} = 0,97 \text{ \AA}$ et $\text{Cd}^{2+} = 0,99 \text{ \AA}$) et sa configuration électronique ressemblent beaucoup à ceux du Ca^{2+} (Tessier *et al.*, 1993). Cette analogie se traduit par des comportements en solution et une réactivité aux interfaces solide/solution voisins (Stipp *et al.*, 1992; Van *et al.*, 1993).

L'interaction entre le Cd et le Ca a été largement étudiée depuis l'apparition de la maladie d'Itai-itai observée après un épisode de contamination de champs de riz par le Cd au Japon. Cette maladie se caractérise par de l'ostéomalacie très douloureuse et une insuffisance rénale (Godowicz, 1990). Beaucoup de résultats existent en ce qui concerne les interactions Cd-Ca. Au niveau des branchies de mollusques, le Cd se comporte comme un analogue du Ca et sa diffusion facilitée serait assurée par des canaux calciques voltage-dépendant (Tessier *et*

al., 1993). Des études effectuées sur des rats (Sorrell, 1977) et sur les cellules cryptales HIEC (en présence de Zn) (Bergeron et Jumarie, 2006) ont montré que le Cd inhibe le transport intestinale du Ca alors que l'équipe de Hamilton *et al.* (1978) a démontré que le Ca n'inhibe pas l'accumulation du Cd ce qui peut signifier, mais n'en ai pas la preuve, que les interactions Ca-Cd sont de type non compétitif.

Les déformations au niveau des os ont donc été attribuées au Cd qui interfère avec les processus de calcification et de décalcification et du remodelage osseux (Ando *et al.*, 1981). D'autres recherches effectuées sur divers tissus (intestin, rein, foie) ont montré que le Cd a une grande affinité pour certains canaux calciques et les sites de liaison intracellulaires du Ca. Ceci a été démontré en utilisant différents inhibiteurs ou bloqueurs des canaux calciques tels que le diltiazem, le verapamil, la nifedipine et la nitrendipine (Hinkle *et al.*, 1987; Blazka et Shaikh, 1992; Borowitz et McLaughlin, 1992). Dans notre projet, il s'avère important d'étudier si le Cd peut emprunter une voie de transport calcique lors de l'accumulation dans les cellules pulmonaires.

D'autres études ont aussi montré que l'absorption intestinale du Cd varie en grande partie avec la présence d'éléments autres que le Ca comme le Fe et les protéines (Hallenbeck, 1984). Les interactions entre le Cd et d'autres éléments essentiels tels que le Zn et le Fe ont été aussi largement étudiées. Des études

des précédentes ont montré que 100 μ M de Zn décroît la sensibilité des fibroblastes humains au Cd (Lin *et al.*, 1995). Il semble que le Zn stimule l'expression des métallothionéines (MT) qui forment un complexe avec le Cd, le rendant alors indisponible donc moins toxique (Lin *et al.*, 1995). D'autre part, il est possible de considérer que le Zn entre en compétition avec le Cd au niveau du système de transport membranaire ce qui diminue l'accumulation cellulaire de Cd (Mishima *et al.*, 1995). L'étude des interactions Cd-Fe chez les êtres humains a aussi montré que les femmes souffrant d'une carence en Fe absorbent jusqu'à 20% du Cd ingéré (Flanagan *et al.*, 1978). Il semble que le Cd emprunte une voie de transport du Fe, NRAMP2 qui est aussi appelé DMT1 (Gunshin *et al.*, 1997; Elisma et Jumarie, 2001).

En milieu professionnel, les travailleurs sont le plus souvent confrontés à des interactions entre différents agents toxiques présents dans les lieux de travail, ce qui peut moduler l'amplitude ou la nature des manifestations toxiques. En ce qui concerne les interactions entre divers métaux toxiques, certaines recherches ont montré que le transport intestinal du Cd est inhibé par le Pb, le Ni, le Cr, le Mg (Foulkes, 1985; Aduayom et Jumarie, 2005) et le Hg (Aduayom *et al.*, 2003). De même, l'accumulation du Cd dans les hépatocytes de rats est inhibée par le Hg et certains éléments essentiels tels que le Zn, le Cu et le Fe (Blazka *et al.*, 1992). Fortoul et al. (2005) ont mesuré de fortes teneurs en Cd et en Pb dans les tissus pulmonaires causant des dommages cellulaires chez la souris après inhalation de CdCl_2 et de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$. En revanche, l'inhalation d'un mélange de Pb et de Cd décroît fortement la teneur en Pb dans les tissus pulmonaires. Ainsi, les effets du Cd sur le poumon sont prédominants. Sa toxicité est liée à la production d'espèces oxydantes. L'hypothèse proposée par Fortoul et al. (2005) est que le Cd diminuerait la solubilité du Pb entraînant une plus faible concentration tissulaire en Pb comparativement au Cd.

L'effet des interactions entre métaux sur le transport membranaire a été principalement étudié au niveau du rein, du foie et de l'intestin. De ce fait, il s'avère important d'étudier l'effet de mélanges de métaux (Cd, Pb et Hg) sur la toxicité et l'accumulation dans les cellules pulmonaires.

CHAPITRE III

L'APPAREIL RESPIRATOIRE

Pour vivre, nous avons besoin d'oxygène. La fonction principale de l'appareil respiratoire est d'assurer l'oxygénation du sang et l'élimination du gaz carbonique. Les poumons ainsi que la trachée et l'œsophage sont situés, tout comme le cœur, dans la cage thoracique. Les poumons sont divisés en différentes sections, les lobes pulmonaires. Il y a trois lobes dans le poumon droit et deux dans le poumon gauche. Ces lobes fonctionnent comme des unités indépendantes et ont chacun sa bronche principale et son alimentation en sang. Autour des poumons se trouve la plèvre (figure 3.1). Elle entoure les poumons d'une double feuille. La feuille interne est collée au poumon, la feuille externe est collée à la cage thoracique. À la partie inférieure des poumons se trouve le grand muscle respiratoire qu'on appelle le diaphragme. Il est traversé par la veine cave inférieure et l'aorte.

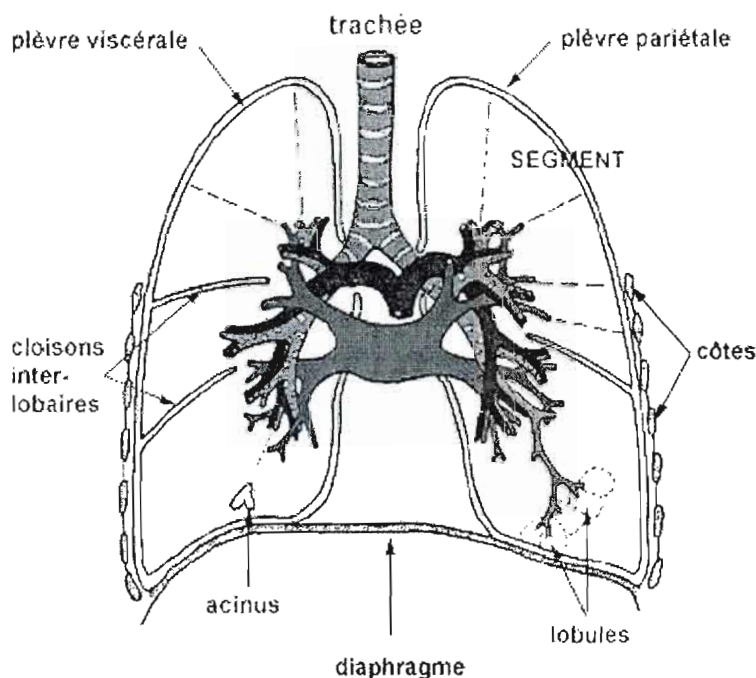


Figure 3.1 Schéma montrant les deux poumons enveloppés par les deux feuillets de la plèvre et entourés par les côtes et le diaphragme

3.1 Voies supérieures et bronchioles

Les voies aériennes supérieures correspondent à l'ensemble des conduits permettant à l'air d'accéder aux poumons (nez et bouche, naso et oro pharynx, larynx où se séparent les voies respiratoires et digestives) (figure 3.2). L'air parvient ensuite au niveau de la trachée qui se divise en deux bronches souches. Les voies aérophores intrapulmonaires constituent l'arbre bronchique dont le "tronc" est la bronche souche (1.5 cm de diamètre) et les "branches" sont de multiples ramifications (25 à 30) de plus en plus étroites avec, comme derniers "rameaux", les bronchioles terminales (0.5 mm de diamètre). Au niveau des bronchioles (environ 500 000), se trouvent les cellules de Clara ou cellules en dôme avec un pôle apical caractérisé par la présence de quelques microvillosités irrégulières et de grains de

sécrétion. Ces cellules sécrètent par exocytose une substance tensio-active analogue au surfactant se répandant à la surface bronchiolaire (Huchon, 2001). Ceci permet de créer une couche de mucus tapissant les voies et qui permet aux particules (poussières, bactéries...) de s'y impacter.

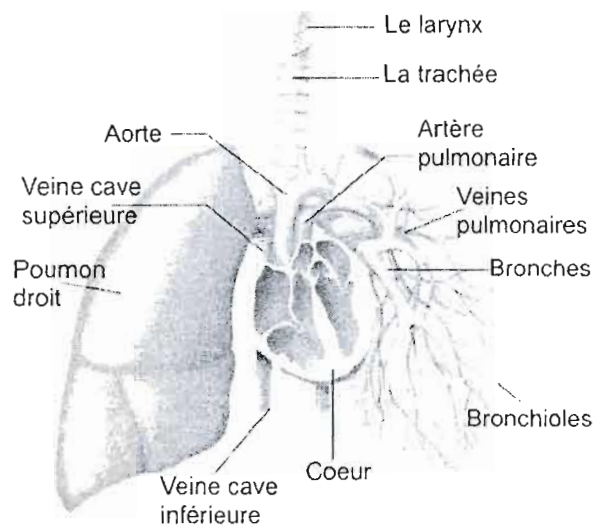


Figure 3.2 Schéma représentant les voies aérophores intrapulmonaires au niveau du poumon gauche

3.2 Les alvéoles pulmonaires

Au niveau de la partie distale de l'appareil respiratoire, les échanges gazeux s'effectuent dans des cavités sphériques qu'on appelle alvéoles qui sont bordées d'un épithélium simple pavimenteux permettant une relation étroite entre l'air inspiré et le sang (figure 3.3). Il y a plus de 300 millions d'alvéoles dans les poumons d'un être humain adulte (Stephen *et al.*, 2004). À ce niveau on trouve des cellules minces adaptées aux échanges gazeux, les pneumocytes de type I, ainsi que des cellules sécrétrices de surfactant alvéolaire nommées pneumocytes de types II (figure 3.4). Le surfactant pulmonaire a à la fois un rôle dans le maintien de l'intégrité physique des alvéoles, en agissant comme une barrière contre

l'infiltration du plasma sanguin, mais aussi un rôle dans la régulation de la tension de surface. Il intervient dans la physiologie pulmonaire, non seulement par son rôle d'agent tensio-actif, mais également par son implication dans les mécanismes de défense contre les infections pulmonaires. Il fixe les particules qui sont ensuite phagocytées par les macrophages alvéolaires (Bourbon, 2005).

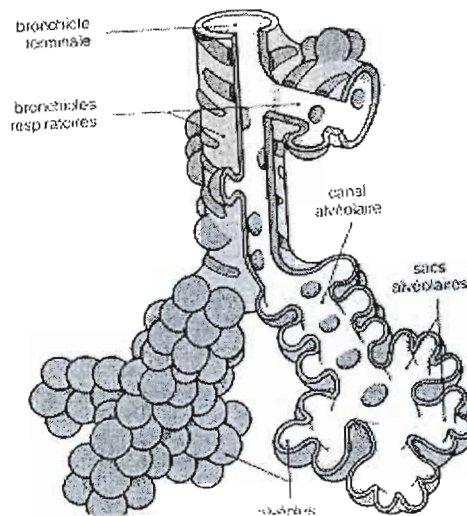


Figure 3.3 Schéma montrant le rapport entre Bronchiole terminale, bronchiole respiratoire, canaux alvéolaires, sacs alvéolaires et alvéoles

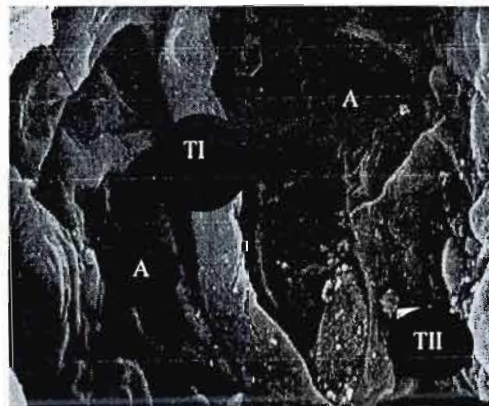


Figure 3.4 : Sac alvéolaire en microscopie électronique s'ouvrant dans deux alvéoles (A). Les deux alvéoles sont séparées par une cloison recouverte par le cytoplasme d'un pneumocyte de type I (TI). On peut voir aussi un pneumocyte de type II (TII) arrondi dans l'alvéole de droite

Les pneumocytes de type I sont de grandes cellules aplaties de 0.2 à 0.5 μm d'épaisseur. Leur cytoplasme très étendu forme un voile très fin. Ces cellules représentent 40% de la population cellulaire mais recouvrent 90% de la surface alvéolaire. Les pneumocytes de type II sont des cellules plus hautes en forme de pyramide tronquée et ont un noyau central arrondi clair et un cytoplasme riche en grains de sécrétion. Les études de structures fines par microscopie montrent de nombreuses microvillosités apicales, un appareil de Golgi et un réticulum endoplasmique développés et la présence de nombreux corps lamellaires osmiophiles composés de phospholipides et de protéines à l'origine du surfactant pulmonaire. Les pneumocytes de type II produisent tous les constituants du surfactant alors que les cellules de Clara ne produisent pas tous les constituants protéiques (figure 3.5). Les pneumocytes de type II représentent 60% de la population cellulaire mais recouvrent seulement 5 à 10% de la surface alvéolaire. Ils peuvent se différencier et se multiplier pour donner naissance à des pneumocytes de type I en cas de lésions parenchymateuses d'origine inflammatoire ou infectieuse.

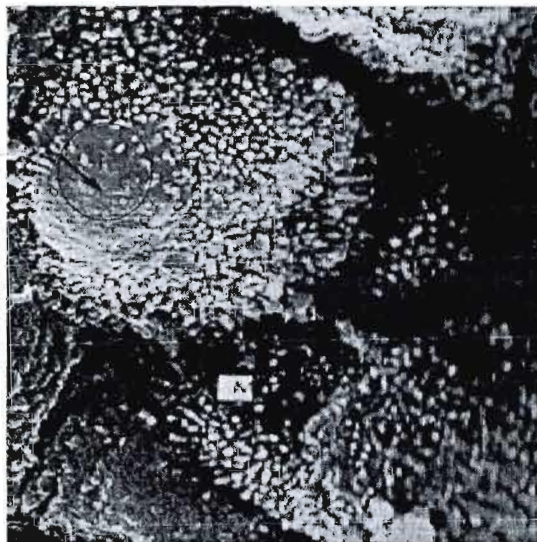


Figure 3.5 : Pneumocyte de type II en microscopie électronique à balayage. Noter les microvillosités (M) et les petites quantités de substance granulaire (flèche) qui représentent du surfactant récemment sécrété

3.3 Dépôt de particules atmosphériques

Le poumon est un véritable filtre qui protège les 70 m² de surface d'échange alvéolaire. Les fonctions d'épuration se font à tous les étages de l'appareil respiratoire et par différents mécanismes. Les particules pénètrent notamment en fonction de leur taille et diamètre, de leur forme et de leur densité (Aubier *et al.*, 1996).

Les particules atmosphériques sont constituées d'un mélange complexe qui varie en fonction du lieu et de la période de l'année. Elles peuvent provenir de sources naturelles ou anthropiques. Elles sont également susceptibles de transporter des produits toxiques tels que les métaux, des composés organiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques : HAP) ou des allergènes. En général, les particules dont le diamètre aérodynamique est compris entre 5 et 30 µm se déposent surtout dans la zone rhino-pharyngienne (voies aériennes supérieures, c'est-à-dire, nez, cavité nasale et gorge). Les petites particules d'un diamètre aérodynamique d'environ 1 à 5 µm se déposent dans la zone trachéobronchique (trachée-artère et tubes bronchiques supérieurs). Lorsque l'air atteint la zone alvéolaire, sa vitesse est encore plus faible et, à toutes fins pratiques, il est stagnant. Habituellement, seules les matières particulaires de 1 µm ou moins peuvent atteindre cette zone terminale des poumons (Hoffmann et Bergmann, 1998) (figure 3.6).

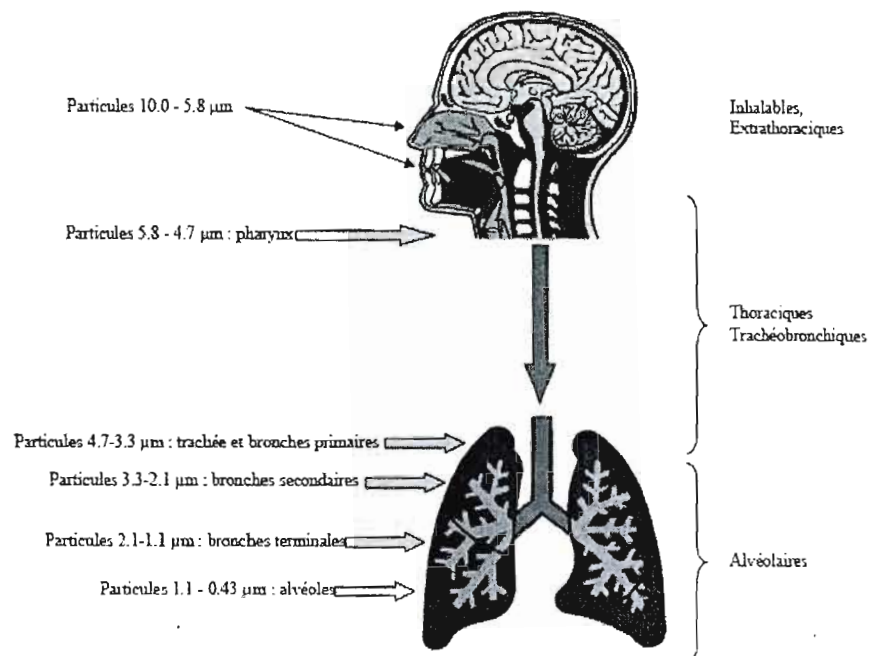


Figure 3.6 : Pénétration des particules dans l'appareil respiratoire

3.4 Système immunitaire alvéolaire

Physiologiquement, les alvéoles pulmonaires sont envahies en permanence par de nombreuses poussières qui n'ont pas été arrêtées au niveau des voies respiratoires supérieures et de l'arbre trachéo-bronchique. Cependant, seules les particules de petite taille parviennent à gagner les alvéoles, en quantité plus ou moins grande selon le degré d'empoussièrement des lieux. Ces particules se déposent à la surface alvéolaire en même temps que le flux aérien cesse à ce niveau. La dégradation de ces particules est alors essentiellement faite par les macrophages alvéolaires qui représentent plus de 90% des cellules adjacentes à la surface alvéolaire. Le milieu alvéolaire est particulièrement adapté pour promouvoir la clairance phagocytaire. Ces macrophages sont une composante extrêmement importante des défenses pulmonaires puisqu'ils empêchent l'accumulation de corps étrangers dans les sacs alvéolaires. La plupart des substances organiques phagocytées peuvent être lysées grâce aux enzymes lysosomiales. Par ailleurs les macrophages alvéolaires ont une forte action bactéricide qui

leur permet de tuer la majorité des bactéries. Les macrophages « avalent » littéralement les particules puis, selon un mécanisme encore mal connu, atteignent la région où les voies aériennes sont tapissées de cils vibratiles. Ces cils, animés de mouvements ondulatoires, font ensuite remonter les macrophages jusque dans la gorge où ils sont expulsés par la bouche (Stevens, 1991).

Lorsque les macrophages ne sont pas capables d'éliminer à eux seuls les bactéries intra-alvéolaires, ce sont le plus souvent des neutrophiles polynucléés qui interviennent à leur tour. Le nombre de macrophages peut augmenter considérablement dans le poumon suite à une réaction inflammatoire. Cependant, malgré ce remarquable système de protection, des poussières inhalées franchissent la paroi alvéolaire et pénètrent dans le liquide interstitiel puis dans le milieu sanguin.

3.5 Toxicité des particules et métaux

Les études toxicologiques ont joué un rôle important dans la compréhension des effets biologiques des particules atmosphériques. Les particules de diamètre supérieur à 30 μm pénètrent rarement dans les voies respiratoires et n'ont guère d'importance toxicologique (Lauwerys, 1999). Les particules nettement plus fines ($< 1\mu\text{m}$) peuvent passer au travers de l'épithélium alvéolaire, puis parvenir dans le système lymphatique et le système sanguin (Donaldson *et al.*, 2001) : il s'agit du phénomène de translocation. La translocation de particules ultrafines à travers les barrières biologiques chez l'humain a été démontrée par des études réalisées avec des nanoparticules de carbone de 20 nm marquées au technicium 99. Pour l'une d'entre elles, une translocation rapide vers le sang et une accumulation significative dans le foie ont été observées (Nemmar *et al.*, 2002). De plus, si l'on considère aussi les études réalisées chez l'animal, il paraît hautement probable que les particules ultrafines puissent passer la barrière épithéliale vers l'interstitium pulmonaire (Elder *et al.*, 2006). Elles seraient aussi capables de franchir la paroi des vaisseaux et de se retrouver dans le flux sanguin, distribuées ensuite dans l'organisme. Le foie est le site majeur d'accumulation, mais une accumulation mineure dans le cœur et dans le rein ont également été observées (Akerman *et al.*, 2002).

Les particules possèdent donc un pouvoir nocif sur les organismes. À cela s'ajoute le caractère toxique des composés chimiques qu'elles transportent (Alleman, 1997). En effet, les métaux tels que le Pb, le Cd et le Hg associés aux particules atmosphériques sont reconnus pour leur toxicité, d'autant plus quand ils se trouvent dans la fraction la plus fine des particules atmosphériques (Fortoul, 2005). Après inhalation de particules atmosphériques, le Zn engendre des réactions inflammatoires au niveau pulmonaire avec notamment une augmentation significative du nombre de macrophages alvéolaires et de leucocytes (Kodavanti *et al.*, 1998; Adamson *et al.*, 2000). Par ailleurs, la présence de plusieurs de ces métaux dans les particules peut modifier leur toxicité, soit en l'accentuant, soit en la diminuant (Carpenter *et al.*, 2002; Pohl *et al.*, 2003). Une étude menée par Monn et Becker (1999) a montré que la toxicité de particules urbaines dites grossières est amoindrie en présence de desferrioxamine, un chélateur de métaux de transition, témoignant ainsi du rôle non négligeable que peuvent jouer les métaux dans la toxicité des particules atmosphériques.

La spéciation des métaux semble aussi jouer un rôle important dans la toxicité des particules atmosphériques. Obersdörster (1992) a montré qu'il est nécessaire de distinguer la solubilité des particules dans l'eau et la solubilité dans le poumon. En effet, des particules de CdO et de CdS qui sont insolubles dans l'eau sont au contraire facilement mises en solution dans le poumon et sont essentiellement évacuées par un effet de transport mécanique via les macrophages alvéolaires. Ainsi, on comprend l'importance de connaître la spéciation des métaux pour évaluer leur toxicité.

3.6 Vulnérabilité pulmonaire aux métaux lourds

Certaines professions exposent les travailleurs à des substances multiples dont les effets éventuels peuvent être additifs ou synergiques sans qu'il soit possible de discerner de manière précise le ou les toxique(s) impliqué(s). C'est le cas des employés travaillant dans les mines de fer ou dans les fonderies, lieux où les carcinogènes potentiels sont variés tels que retrouvés dans la fumée de différents métaux. En effet, pendant sa vie professionnelle,

un sujet ventile entre 25 et 100 x 10³ m³ d'air sur son lieu de travail. De ce fait, il est évident qu'un polluant, même présent à de faibles concentrations, peut entraîner des lésions de l'appareil respiratoire (Martinet, 1999). En considérant la diversité cellulaire de l'appareil respiratoire (40 types cellulaires différents) et le mode de dépôt des particules, les métaux lourds inhalés peuvent donc toucher différents types de cellules et plusieurs segments de l'appareil respiratoire. On peut donc considérer que le poumon est le premier organe cible des toxiques inhalées (Sorokin, 1970).

CHAPITRE IV

LIGNÉES CELLULAIRES

Les lignées cellulaires sont susceptibles d'apporter de plus amples informations sur les mécanismes de transport membranaire responsables de l'accumulation de métaux dans les cellules de divers organes comparativement aux études *in vivo* ne permettant pas d'observer les processus à l'échelle cellulaire. Dans ce projet, nous utiliserons deux lignées aux phénotypes cellulaires distincts et représentant deux sites différents de l'appareil respiratoire.

4.1 La lignée A549

La lignée A549 provient d'un adénocarcinome pulmonaire humain (Smith *et al.*, 1977) (figure 4.1). Elle a les caractéristiques morphologiques et biochimiques des pneumocytes de type II dont l'expression du canal sodique ENaC très important pour le drainage du liquide alvéolaire (Mairbäurl *et al.*, 1997 ; Lazrak *et al.*, 2000). Les cellules A549 contiennent aussi des corps lamellaires et synthétisent tous les constituants du surfactant bien que cette production semble discrète (Lieber *et al.*, 1976, Smith *et al.*, 1977). Elles expriment également plusieurs enzymes du cytochrome P450 (Foster *et al.* 1998) ce qui en font un modèle très intéressant pour étudier le phénomène de bioactivation de contaminants atmosphériques.

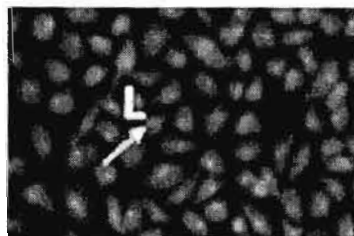


Figure 4.1 : Image en microscopie à fluorescence de cellules vivantes (L) de la lignée A549. (Aruna *et al.*, 2008)

Cette lignée est assez utilisée pour étudier le transport et la toxicité de plusieurs métaux. Dans une étude récente, les cellules A549 ont été utilisées pour déterminer les effets toxiques de la fumée de cigarette (Kode *et al.*, 2008). Plusieurs autres études ont montré que ces cellules accumulent rapidement le Cd (Hatcher *et al.*, 1995 ; Croute *et al.*, 2000) et un processus saturable à haute affinité a été caractérisé pour le transport de Cd inorganique (Jumarie, 2002). Aussi, Heilig *et al.* (2006) ont étudié le transport membranaire de deux métaux essentiels: le Fe et le manganèse (Mn). Les résultats indiquent que le transport du Mn et du Fe s'effectue par deux voix distinctes. L'exposition des cellules A549 au Ni diminue le niveau cellulaire du Fe (Chen *et al.*, 2005) et cause un stress oxydatif (Konstantin *et al.*, 2000).

La toxicité du Cd a aussi beaucoup été étudiée dans les cellules A549. En exposant cette lignée au Cd, il a été démontré que la surexpression des protéines de stress (HSP) est due, d'une part, au stress oxydatif résultant de la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et d'autre part, à l'inhibition des processus de détoxification des peroxydes ce qui endommage les protéines cellulaires (Croute *et al.*, 2000). La toxicité de différentes nanoparticules a aussi été étudiée dans cette lignée. En effet, l'exposition des cellules A549 à certaines particules semble avoir un effet délétère sur l'ADN cellulaire (Danielsen *et al.*, 2008; Pyrgiotakis *et al.*, 2008).

D'autres études ont caractérisé l'effet d'un des ligands impliqué dans la cytoprotection contre la toxicité du Cd: le GSH. Dans cette étude, deux types de cellules A549 ont été utilisées, des cellules sensibles et des cellules résistantes au Cd (Kang et Enger,

1990). Les résultats indiquent que les cellules résistantes ont un niveau de GSH deux fois plus élevé que les cellules sensibles. La résistance serait associée au niveau élevé de GSH plutôt qu'aux activités enzymatiques antioxydantes (Hatcher *et al.*, 1995).

4.2 La lignée H441

La lignée H441 provient d'un adénocarcinome pulmonaire (figure 4.2). Ces cellules ont des caractéristiques de cellules bronchiolaires terminales (cellules de Clara) tout en présentant certaines propriétés des pneumocytes de type II. Les cellules H441 produisent les protéines du surfactant pulmonaire SP-A et SP-B mais pas SP-C. La régulation hormonale de l'expression de la SP-A et de la SP-B dans cette lignée est similaire à celle observée dans les pneumocytes de type II (O'Reilly *et al.*, 1989).

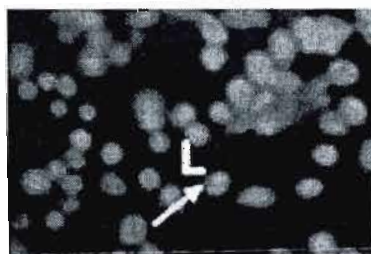


Figure 4.2 : Image en microscopie à fluorescence de cellules vivantes (L) de la lignée H441. (Aruna *et al.*, 2008)

Comme pour les cellules A549, la toxicité de la fumée de cigarette a été étudiée sur les cellules H441 (Kode *et al.*, 2008). Cependant, à notre connaissance, il n'y a pas d'autres études de toxicologie qui ont été effectuées sur cette lignée et nous la mettrons à profit afin de caractériser l'accumulation cellulaire et la toxicité de métaux lourds en fonction du phénotype cellulaire.

CHAPITRE V

HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS

5.1 Objectifs et hypothèses de recherche

Dans les chapitres précédents nous avons présenté la toxicité du Cd, du Hg et du Pb sur divers organes cibles, notamment l'appareil respiratoire très exposé et sensible aux métaux. L'étude de la toxicité pulmonaire des métaux s'avère très importante pour l'évaluation du risque et le raffinement de normes environnementales. Dans notre projet nous avons ciblé deux sites différents au niveau de l'appareil respiratoire étant donné que le poumon représente le premier organe cible des toxiques inhalés. Nous avons choisi deux phénotypes pulmonaires distincts soient la lignée A549 et la lignée H441.

Notre premier objectif était d'évaluer le potentiel toxique de trois métaux lourds : le Cd, le Pb, et le Hg, utilisés seuls ou en combinaisons multiples dans les deux lignées cellulaires. Des études d'accumulation du Cd, ont aussi été effectuées dans les mêmes conditions d'exposition que pour les mesures de toxicité afin de vérifier l'existence des interactions possibles entre le Cd, le Hg et le Pb pour le transport membranaire, se traduisant par des variations de niveaux d'accumulation cellulaire et possiblement de toxicité. Nous avons émis l'hypothèse qu'il existe une corrélation entre les niveaux d'exposition, les contenus cellulaires et le potentiel toxique.

Notre deuxième objectif était de caractériser le transport membranaire du Cd dans les deux lignées. Cette approche permet de bien comprendre comment le Cd est absorbé par la voie pulmonaire en déterminant les paramètres cinétiques de transport. Notre hypothèse

stipulait que le transport membranaire du Cd est affecté par la spéciation du métal et aussi s'il implique, du moins en partie, un système de transport spécifique et possiblement des voies calciques.

Nous émettions aussi l'hypothèse que la toxicité et le transport membranaire du Cd varient d'une lignée à l'autre. Ainsi nous devrions être en mesure d'évaluer des paramètres de toxicité, des propriétés cinétiques et des interactions entre métaux variables dans les cellules A549 et H441. Nous avons comparé la sensibilité au Cd (en absence et en présence d'autres métaux) ainsi que les profils d'accumulation cellulaire obtenus dans les deux lignées. Des études précédentes ont caractérisé le transport membranaire du Cd dans les cellules A549, en revanche rares sont les études qui ont utilisé la lignée H441 et aucune ne traite de spéciation.

CHAPITRE VI

MATÉRIELS ET MÉTHODES

6.1 Culture cellulaire

Les deux lignées A549 et H441 ont été obtenues d'American Type Culture Collection. Les cellules A549 ont été cultivées dans du milieu F12 (GibcoBRL) auquel 146 mg/l de L-glutamine, 1.5 g/l de NaHCO_3 , 50 U/ml de pénicilline et 50 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine ont été ajoutés. Les cellules H441 ont été maintenues dans du milieu RPMI (GibcoBRL) additionné de 2.5 g/l de glucose, de 2.383 g/l d'HEPES, de 0.11 g/l de Na-pyruvate, de 1.5 g/l de NaHCO_3 , 50 U/ml de pénicilline et de 50 $\mu\text{g/ml}$ de streptomycine. Le pH des milieux de culture était ajusté à 7.2. En utilisant un filtre de 0.22 μm stérile, les milieux ont été stérilisés sous la hotte à flux laminaire. Après cette étape, 10% (v/v) de sérum bovin fœtal (FBS) inactivé (30 min à 58 °C) était ajouté dans le milieu F12 de la lignée A549 et 7.5% (v/v) dans le milieu RPMI de la lignée H441.

Le repiquage des cellules s'est fait enzymatiquement par trypsination (0.05% de trypsine – 0.053 mM d'EDTA) soit sur des boîtes de pétris de 35 mm de diamètre avec 0.12×10^6 cellules/pétri ou sur des plaques à 96 puits avec 5000 cellules/puit. À partir de la concentration cellulaire obtenue des bouteilles stock et évaluée à l'aide d'un hématimètre, le volume nécessaire à prélever était calculé pour ensemercer avec un nombre de cellules voulu. Ce volume était ensuite complété avec du milieu de culture pour obtenir un volume final de 2 ml/pétri et 200 μl /puits dans les plaques à 96 puits. Aussi, des flacons devaient

être ensemencées avec 20 ml de milieu de culture et 2×10^6 cellules afin d'avoir des bouteilles de maintien en stock.

Les cellules H441 et A549 étaient incubées à 37°C dans une atmosphère à 5% de CO₂ et les milieux étaient changés tous les deux jours avec du milieu de culture déjà chauffé dans un bain-marie à 37 °C. La lignée H441 a été utilisée le jour 9 et la lignée A549 le jour 14.

6.2 Transport membranaire et accumulation cellulaire de ¹⁰⁹Cd et de ⁴⁵Ca

Afin d'étudier le transport membranaire du Cd et du Ca, deux isotopes radioactifs ont été utilisés: le ¹⁰⁹Cd et le ⁴⁵Ca. L'utilisation de ces marqueurs s'avère très importante. Leur relative longue demi-vie et leur activité spécifique élevée permettent l'usage de ces traceurs à de très faibles concentrations. Toutes nos expériences de transport ont été effectuées à 37 °C.

Les étapes de mesure du transport membranaire de ¹⁰⁹Cd et de ⁴⁵Ca étaient similaires. Les boîtes de pétris étaient rincées 4 fois avec 2 ml de tampon chlorure (Cl⁻) contenant 137 mM de NaCl, 5.9 mM de KCl, 1.2 mM de MgSO₄, 2.5 mM de CaCl₂, 4 mM de glucose et 10 mM d'HEPES. Ce rinçage est très important afin d'enlever au maximum le milieu de culture et d'éviter ainsi les liaisons du Cd avec les acides aminés et le FBS contenus dans le milieu et pouvant modifier (de façon non contrôlée) la spéciation et le transport du Cd (Kojima *et al.*, 1985; Moberg, 1993; Berglund *et al.*, 1994). Ainsi les conditions d'exposition et le transport membranaire étaient optimisés et l'analyse des résultats obtenus facilitée. Les cellules étaient ensuite exposées à 1 ml de milieu de transport contenant 0.3 µM de ¹⁰⁹Cd (0.1 µCi/ml) ou 0.5 mM de ⁴⁵Ca (2 µCi/ml).

Après une durée d'exposition bien déterminée, le transport était cessé en enlevant le milieu puis en rinçant les pétris 4 fois avec 2 ml de tampon stop EDTA à 4°C. La composition de ce tampon était similaire au tampon Cl⁻ de rinçage, mais contenait 2 mM d'EDTA (puissant chélateur) sans MgSO₄ ni CaCl₂ (remplacés par du NaCl) pour garder

l'EDTA libre de toute liaison avec le Ca ou le Mg et ainsi permettre de chélater au maximum le Cd adsorbé sur la surface externe de la membrane plasmique. Par la suite, les cellules étaient solubilisées avec 500 μ l de NaOH (1N) pendant 2 à 3 h. Ensuite, 300 μ l de l'homogénat cellulaire total étaient prélevés afin de déterminer la radioactivité en utilisant le compteur gamma pour le ^{109}Cd . Dans le cas du ^{45}Ca , 300 μ l d'homogénat étaient mélangés à 10 ml de liquide à scintillation pendant 24 h avant la lecture au compteur bêta. Dans les deux cas, des aliquotes de 50 μ l étaient utilisées pour le dosage des protéines.

Afin de vérifier nos hypothèses, les milieux et les conditions d'exposition, pour les mesures d'accumulation cellulaire, variaient selon l'objectif de l'étude. En milieu Cl^- , l'accumulation temporelle du Cd a été étudiée avec des temps d'exposition variant de 3 min à 1 h en absence et en présence d'un excès de Cd non radioactif. L'ajout du Cd non radioactif en excès dans le milieu d'exposition permettait ainsi de déterminer les composantes spécifiques et non spécifiques du transport.

Étant donné que la spéciation du Cd est affectée par la composition du milieu, nous avons déterminé les paramètres cinétiques du transport (K_m : constante d'affinité et V_{\max} : vitesse maximale de transport) en utilisant deux milieux d'exposition différents. Il s'agit du milieu de transport Cl^- (même composition que le milieu de rinçage décrit précédemment) et du milieu nitrate (NO_3^-) qui contient : 137 mM de NaNO_3 , 5.9 mM de KNO_3 , 1.2 mM de MgSO_4 , 2.5 mM de CaNO_3 , 4 mM de glucose et 10 mM d'HEPES. Le milieu Cl^- contient une grande quantité de sels chlorés et permet ainsi la formation des chlorocomplexes. Cependant, en milieu nitrate, le NO_3^- a moins d'affinité pour le Cd, et nous générions ainsi une grande quantité d'ion libre (Tableau 6.1). Nos mesures étaient effectuées à temps fixe mais en conditions de vitesse initiale (3 minutes) en faisant varier la concentration du Cd non radioactif de 0 à 100 μM .

Milieu chlorure		Milieu nitrate	
pH 7.5		pH 7.5	
Espèces	% Total	Espèces	% Total
CdCl^+	61.3	Cd^{2+}	80.4
CdCl_2	20.7	CdNO_3^+	11.7
Cd^{2+}	14	CdHCO_3^-	5.3
CdCl_3^-	1.9	CdSO_4	1.7

Tableau 6.1 : Spéciation du Cd en milieu chlorure et nitrate (Elisma et Jumarie, 2001)

En ce qui concerne les interactions Cd-Ca, nous avons estimé dans quelle mesure la composante spécifique du transport de Cd peut impliquer un transport de Ca en étudiant parallèlement le transport de ^{45}Ca et en menant des études de compétition croisée. Ceci a aussi été fait en conditions dépolarisante (remplacement du sodium (Na) externe par du potassium (K)) afin de vérifier s'il existe des transporteurs de Ca dépendants du voltage qui pourraient transporter le Cd. Le temps d'exposition a été fixé à 5 min, et ces expériences ont été menées en milieu nitré afin de favoriser les interactions Cd^{2+} et Ca^{2+} .

Nous avons aussi étudié le transport de Cd en présence de concentrations variables de Pb et de Hg non radioactifs afin d'évaluer les effets additifs, aussi bien que synergiques ou antagonistes entre les métaux. Ces concentrations ont été déterminées après avoir fait des études préliminaires de cytotoxicité afin de déterminer les valeurs de LC_{50} (concentration d'exposition létale pour 50% de la population cellulaire) de chaque métal.

6.3 Dosage de protéines

Le dosage des protéines était effectué selon la méthode de Bradford (1976) à l'aide d'une courbe d'étalonnage établie avec de l'albumine sérique (BSA). Dans une plaque à 96 puits, 50 μl d'échantillons étaient déposés. Par la suite, 250 μl du réactif étaient ajoutés avant de mesurer l'absorbance à 595 nm. Ceci permettait de déterminer la quantité de

protéines contenues dans l'homogénat cellulaire et d'exprimer les résultats d'accumulation par rapport aux protéines cellulaires. Le choix de cette normalisation se justifie par le fait que le contenu en protéines totales est généralement un bon reflet du nombre de cellules.

6.4 Test de viabilité : MTT

Dans ce projet, le « thiazolyl blue tetrazolium bromide » (MTT) a été utilisé pour effectuer des études de cytotoxicité en mesurant la viabilité cellulaire. Le test mesure la réduction du MTT par les réductases NADPH mitochondriales des cellules vivantes. Une fois réduit, le MTT, étant un sel jaune, forme un produit cristallisé de formazan de couleur bleu-violet. Ces cristaux bleu-violet étaient par la suite solubilisés dans du DMSO ce qui permettait de mesurer la densité optique par colorimétrie à une longueur d'onde de 575 nm. Ainsi, plus la mortalité cellulaire augmente, plus la densité optique diminue.

Afin d'étudier la cytotoxicité des métaux, les cellules H441 et A549 ont étéensemencées sur des plaques à 96 puits à raison de cinq répliquats pour chaque condition. Le traitement était effectué au jour 9 pour la lignée H441 et au jour 14 pour la lignée A549, en ajoutant 100 µl de milieu d'exposition dans chaque puit. Ces milieux étaient du milieu de culture (F12 ou RPMI) contenant les différents mélanges de métaux sans FBS pour que les métaux ne se complexent pas avec l'albumine. Les cellules étaient ainsi incubées durant 24 h à 37 °C et 5% de CO₂ après quoi, 10 µl de la solution MTT étaient ajoutés dans chaque puit et les plaques étaient incubées à la noirceur durant 4 h. Après cette étape, le DMSO était ajouté à raison de 200 µl/puit et après 10 à 15 min d'incubation, les cristaux étaient bien dissous et la lecture de la densité optique se faisait à 575 nm.

Dans ce projet, le test de viabilité cellulaire était utilisé pour déterminer le potentiel toxique de différents métaux et mieux investiguer les effets possiblement additifs ou antagonistes entre métaux. Des résultats préliminaires indiquaient que les cellules A549 sont plus sensibles. Ainsi, les concentrations de métaux utilisées pour traiter les cellules A549 étaient: 0, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 300 et 500 µM tandis que les concentrations

additionnelles de 800, 1000 et 1500 μM ont été utilisées dans le cas des cellules H441. La LC_{50} de chaque métal était ainsi déterminée.

Afin de mieux caractériser les interactions possibles entre les métaux, les cellules ont été exposées à divers mélanges de métaux pris deux à deux ou en combinaisons multiples. Par exemple, divers mélanges de métaux utilisés à leurs valeurs respectives de LC_{50} nous ont renseigné sur les effets toxiques antagonistes, additifs ou synergiques. Une autre série d'expériences visant à déterminer l'effet d'un métal sur la courbe dose-réponse des cellules à un autre métal ont été effectuées. Par exemple, l'effet du Hg, utilisé à sa propre valeur de LC_{50} , sur la courbe de viabilité cellulaire en réponse au Cd peut ainsi nous renseigner sur un processus de sensibilisation des cellules (déplacement de la courbe vers la gauche) ou de compétition entre les métaux (déplacement de la courbe vers la droite). Parallèlement à ces mesures de viabilité cellulaire, l'accumulation du Cd a été étudiée en milieu de culture sans FBS avec et sans Hg. Les mesures d'accumulation cellulaire de 24 h ainsi faites dans les mêmes conditions d'exposition que pour les mesures de toxicité par dosage d'activités MTT nous ont permis d'établir s'il y a ou non corrélation entre les niveaux d'exposition, les contenus cellulaires et le potentiel toxique.

6.5 Cytométrie de flux (FACS)

Afin de valider l'étude de toxicité cellulaire effectuée par la méthode MTT, la viabilité des cellules A549 exposées au Cd a aussi été mesurée par analyse de cytométrie de flux après marquage à l'iodure de propidium (IP). L'IP est un puissant marqueur de viabilité cellulaire qui se lie aux bases d'ADN des cellules ayant perdu leur intégrité membranaire et permet donc de distinguer facilement les cellules vivantes des cellules mortes.

Les cellules ont été cultivées sur pétri et exposées 24 h dans du milieu de culture sans FBS contenant différentes concentrations de Cd. Trois concentrations différentes ont été choisies. La première représentait la concentration induisant 10% de mortalité cellulaire

(15 μM), la deuxième était la valeur de la LC_{50} (60 μM) et la troisième représentait la concentration pour laquelle au moins 70% de mortalité était observée (120 μM).

Après récupération des milieux d'exposition, les cellules étaient traitées environ 2 min avec 1 ml d'une solution de trypsine. Quand les cellules commençaient à décoller, la trypsine était inactivée par du PBS contenant 10% de FBS. La solution de PBS contenait 137 mM de NaCl, 7.68 mM de Na_2HPO_4 , 2.32 mM de KH_2PO_4 et 2.7 mM de KCl à pH 7.4. Pour chaque condition d'exposition, environ 1×10^6 cellules étaient récupérées, rincées (en ajoutant 2 ml de PBS) puis centrifugées pendant 5 min à 200g et à 20 °C. Le surnageant était alors enlevé, puis 100 μl de binding-buffer (100 mM HEPES, 140 mM NaCl, 2.5 mM CaCl_2 , pH 7.4) étaient ajoutés. Par la suite, 10 μl de PI (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$) étaient ajoutés et la préparation était maintenue à la noirceur. Après un temps d'incubation de 15 min, 400 μl additionnels de binding-buffer étaient ajoutés. La lecture se faisait immédiatement à l'aide du FACS-Scan.

6.6 Analyses statistiques des résultats

En sachant l'activité spécifique du ^{109}Cd et du ^{45}Ca et après avoir estimé les protéines par la méthode de Bradford, les résultats du transport membranaire étaient exprimés en pmol/mg protéine (pour le ^{109}Cd) ou en nmol/mg protéine (pour le ^{45}Ca). Les données d'accumulation cellulaire et de toxicité ont été analysées à l'aide du logiciel Prism (GraphPad, version 4.0). Des analyses de variances (ANOVA) pour échantillons non-pairés ont été aussi utilisées pour les résultats obtenus à temps fixes et qui ne peuvent être analysés par régression. Le test Dunnet à comparaison multiple a été utilisé lorsque deux groupes ou plus doivent être comparés à un groupe contrôle. Lorsqu'il n'y avait pas de groupe contrôle, le test Tukey à comparaison multiples était utilisé afin de comparer plusieurs groupes entre eux. La significativité a été fixée à $p < 0.05$. Sauf indication contraire, chacune de nos expériences a été faite au moins deux à trois fois sur des cultures indépendantes.

6.6.1 Accumulation cellulaire en fonction du temps

L'accumulation temporelle est analysée à l'aide d'une mono-exponentielle croissante selon l'équation 6.1.

Équation 6.1

$$A = A_0 + A_{\max} (1 - \exp(-kt))$$

Où :

A	: Accumulation (pmol/mg de protéine)
A ₀	: Accumulation au temps 0
A _{max}	: Accumulation maximale à l'équilibre
k	: Constante de temps du processus global d'accumulation

6.6.2 Détermination des paramètres cinétiques de transport

Le transport de ¹⁰⁹Cd en présence du Cd non radioactif (utilisé comme inhibiteur compétitif) est analysé par l'équation 6.2. Le transport membranaire du Cd est donc caractérisé par une composante spécifique (1) et non spécifique(2).

Équation 6.2

$$v = \underbrace{\frac{V_{\max} T}{K_m + T + S}}_1 + \underbrace{K_d T}_2$$

Où :

v	: Vitesse initiale
V_{\max}	: Vitesse maximale
T	: Concentration du traceur (0.3 μM)
S	: Concentration du Cd non radioactif (0 - 100 μM)
K_m	: Constante d'affinité

6.6.3 Analyse de la viabilité cellulaire

Les résultats obtenus par la mesure MTT ont été utilisés pour générer des courbes dose-réponse semi-logarithmiques de viabilité cellulaire analysées à l'aide de l'équation 6.3.

Équation 6.3

$$y = y_{\min} + \frac{y_{\max} - y_{\min}}{1 + 10^{(\log LC_{50} - X) \cdot \text{Hillslope}}}$$

Où :

y_{\max}	: Pourcentage de viabilité cellulaire maximale (contrôle)
y_{\min}	: Pourcentage de viabilité cellulaire minimale (capacité maximale de toxicité du métal)
LC_{50}	: Concentration d'exposition létale pour 50% de la population cellulaire

Selon les traitements effectués, nous pouvions comparer les LC_{50} , les pentes et le sens du déplacement de la courbe ce qui renseigne sur l'efficacité toxique des métaux, les interactions ayant un effet additif (diminution de la LC_{50}) ou au contraire antagoniste (augmentation de la LC_{50}) entre plusieurs métaux.

CHAPITRE VII

RÉSULTATS

7.1 Cytotoxicité du Cd, du Pb et du Hg

Afin d'évaluer le potentiel toxique du Cd, du Pb et du Hg dans les cellules A549 et H441, nous avons commencé notre étude par l'analyse de la cytotoxicité de ces trois métaux en utilisant le test de viabilité cellulaire MTT. Les résultats sont exprimés sur des graphiques semi-logarithmiques et analysés selon l'équation 6.3 ce qui permet de déterminer les valeurs de LC_{50} et les plateaux de viabilité cellulaire minimale (mortalité maximale). Afin de mieux évaluer la toxicité des métaux étudiés les pentes des courbes dose-réponse sont aussi déterminées par une analyse de régression linéaire des points se situant entre les plateaux de viabilité maximale et minimale.

7.1.1 Cytotoxicité du Cd et accumulation du ^{109}Cd

Les résultats montrent que dans les deux lignées, la variation du pourcentage de viabilité cellulaire en fonction des concentrations croissantes du Cd consiste en une courbe sigmoïde de type dose-réponse (figure 7.1). En effet, la viabilité cellulaire diminue graduellement en fonction de l'augmentation de la concentration du Cd dans le milieu d'exposition. L'analyse des courbes montrent que la lignée A549, pour laquelle une plus faible valeur de LC_{50} a été déterminée, est deux fois plus sensible au Cd que la lignée H441 (63 μM vs 120 μM). Les pentes des courbes dose-réponse ne varient pas de façon

significative selon les lignées utilisées alors que la valeur du plateau de viabilité minimale semble être plus élevée dans la lignée H441 que pour les cellules A549, indiquant que le pouvoir cytotoxique maximal est plus élevé dans les cellules A549 et confirmant ainsi la grande sensibilité de ces cellules au Cd comparativement à la lignée H441 (tableau 7.1).

Parallèlement aux mesures de viabilité cellulaire du Cd, des mesures d'accumulation cellulaire du ^{109}Cd ont été effectuées dans les mêmes conditions d'exposition que pour les mesures de toxicité dans le but de vérifier l'existence probable de corrélation entre les niveaux d'exposition, les contenus cellulaires et le potentiel toxique. La figure 7.2 montre qu'il n'existe pas de différence significative d'accumulation entre les lignées A549 et H441. Donc, la sensibilité plus grande des cellules A549 au Cd n'est pas attribuable à une accumulation supérieure de Cd et dépendrait peut-être d'autres mécanismes de protection cellulaires différemment exprimés dans les deux lignées.

7.1.2 Cytotoxicité du Hg et du Pb

Concernant le Hg (figure 7.1), les paramètres de toxicité présentés dans le tableau 7.2 indiquent que les différences entre les valeurs de pente, de toxicité maximale et de LC_{50} entre les lignées A549 et H441 ne sont pas significatives. Les pentes de toxicité de la courbe dose-réponse au Hg sont plus élevées comparativement aux courbes en réponse au Cd indiquant que les cellules A549 et H441 sont plus sensibles à une légère augmentation de la concentration de Hg qu'au Cd.

L'exposition des cellules A549 et H441 au Pb dans du milieu de culture sans sérum n'a pratiquement pas induit de mortalité cellulaire malgré les importantes concentrations de Pb testées puisqu'à 500 μM , la mortalité cellulaire est inférieure à 5% (figure 7.1). Il semble donc que le Pb n'ait pas effet sur la viabilité cellulaire dans les cellules A549 et H441, ce qui n'exclue pas la possibilité d'effets toxiques non observables par la mesure de MTT.

7.1.3 Cytométrie de flux (FACS)

Afin de valider l'étude de toxicité cellulaire effectuée par la méthode MTT, on s'est intéressé à évaluer la toxicité du Cd dans la lignée A549 par la méthode de FACS. Les cellules ont été exposées à trois concentrations différentes de Cd (déterminées à partir des courbes dose-réponse obtenues par la méthode MTT) soient 15 μM (plateau maximal de toxicité), 60 μM (LC_{50}) et 120 μM (30% de viabilité cellulaire). Les résultats présentés à la figure 7.3 sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire par rapport à un contrôle mesuré à 0 μM de Cd excluant les cellules mortes toujours retrouvées en culture. En exposant les cellules A549 à 15, 60 et 120 μM de Cd, le pourcentage de viabilité cellulaire a respectivement diminué de 2%, 48% et 83%. Ces valeurs ne diffèrent que très peu de celles obtenues par l'essai MTT confirmant que la mesure MTT est un bon reflet de la viabilité cellulaire (tableau 7.3).

7.2 Caractérisation du transport membranaire du Cd

Dans la section précédente, nous avons démontré que le Cd est cytotoxique dans les deux lignées utilisées et qu'il est accumulé dans les cellules. Il s'avère donc important de caractériser son transport membranaire dans les cellules A549 et H441.

7.2.1 Accumulation temporelle du ^{109}Cd

L'accumulation temporelle du ^{109}Cd est mesurée en utilisant le tampon chlorure, en absence et en présence de 100 μM de Cd non radioactif. Les résultats ont été analysés par régression non linéaire en utilisant l'équation 6.1 et les valeurs obtenues sont présentées dans le tableau 7.4. La figure 7.4 montre qu'en absence d'un excès de Cd non radioactif, l'accumulation du ^{109}Cd augmente en fonction du temps d'exposition. L'existence d'un paramètre A_0 indique une phase initiale rapide d'accumulation cellulaire de ^{109}Cd . Les valeurs

de A_{\max} obtenues montrent que les cellules A549 accumulent quatre fois plus de ^{109}Cd que les cellules H441.

En présence de 100 μM de Cd non radioactif, les valeurs de A_0 et de A_{\max} ont respectivement diminué de 70% et 92% dans les cellules A549 et de 78% et 76% dans les cellules H441 suggérant une compétition entre le ^{109}Cd et le Cd non radioactif pour des sites de transport cellulaires spécifiques (dans le cas de A_0) et possiblement des sites de liaison intracellulaires (dans le cas de A_{\max}). Pour chaque lignée, la différence entre les valeurs des A_0 obtenues en absence et en présence de l'excès de Cd permet de déterminer l'accumulation initiale spécifique de Cd dans les cellules A549 et H441 (respectivement 3.9 et 5.8 pmol de ^{109}Cd /mg de protéine).

7.2.2 Paramètres cinétiques du transport de ^{109}Cd

Étant donné que l'accumulation du Cd implique un système spécifique de transport et que la spéciation du Cd est affectée par la composition du milieu, nous avons déterminé les paramètres cinétiques du transport de Cd (K_m et V_{\max}) en milieux chlorure et nitrate dans lesquels 14% et 80% du métal dissous se retrouve sous forme de Cd^{2+} . Nos mesures ont été effectuées à temps fixe mais en conditions de vitesse initiale (3 min) en faisant varier la concentration du Cd non radioactif de 0 à 100 μM (figure 7.5). Les résultats ont été analysés par régression non-linéaire selon l'équation 6.2 et les valeurs des paramètres cinétiques sont présentés dans le tableau 7.5. Dans les deux lignées, un système de transport à haute affinité pour le Cd inorganique a été caractérisé ($K_m < 5 \mu\text{M}$). Les valeurs de K_m et de V_{\max} ne varient pas selon la spéciation inorganique mais varient d'une lignée à l'autre et sont deux fois plus élevées dans la lignée A549 que dans les cellules H441. L'existence d'une valeur de K_d indique qu'une partie du transport membranaire de Cd s'effectue par diffusion passive. Les résultats indiquent aussi que, étonnamment, dans les deux lignées les valeurs de K_d sont deux fois plus élevées en milieu nitrate qu'en milieu chlorure.

7.2.3 Accumulation de ^{109}Cd en fonction de la spéciation et du pH

Dans le but d'évaluer l'impact du pH et de la spéciation organique et inorganique sur le transport membranaire du Cd, nous avons étudié l'accumulation cellulaire du ^{109}Cd en milieu Cl^- , NO_3^- et DMEM. Nos mesures ont été effectuées à différents pH (5.5 et 7.5) et à temps fixe (15 min) en absence et en présence de 100 μM de Cd non radioactif afin d'identifier la part d'accumulation spécifique dans chaque milieu utilisé. La figure 7.6 montre que le ^{109}Cd est plus transporté en milieux inorganiques (chloré et nitré) qu'en milieu organique (DMEM) contenant différents acides aminés capables de complexer le Cd. L'analyse des résultats indiquent aussi qu'à même pH, les niveaux d'accumulation augmentent légèrement en milieu NO_3^- qu'en milieu Cl^- . Des augmentations significatives de 54% et 13% sont observées à pH 5.5 et 7.5 dans la lignée A549 alors qu'une augmentation non significative de 19% et significative de 28% sont observées dans les cellules H441. Cependant, après soustraction de la composante non spécifique de transport, une augmentation de 44% et une diminution de 12% du transport spécifique est observée à pH 5.5 et 7.5 en milieu NO_3^- dans les cellules A549 alors qu'une augmentation de 11% et 2% est observée dans les cellules H441. Les augmentations de l'accumulation spécifique observées en milieu NO_3^- comparativement au milieu Cl^- dans les deux lignées sont beaucoup plus faibles que les augmentations de concentration du Cd^{2+} dans ce milieu. On peut donc conclure qu'il n'existe aucune corrélation entre l'accumulation de Cd et l'augmentation de la concentration de Cd^{2+} dans le milieu d'exposition. Les résultats démontrent aussi qu'à pH 7.5, la composante non spécifique semble être plus importante en milieu nitrate qu'en milieu chlorure dans les cellules H441 (5.3 vs 1.9 pmol de $^{109}\text{Cd}/\text{mg}$ de protéine) et A549 (7.3 vs 2.5 pmol de $^{109}\text{Cd}/\text{mg}$ de protéine) et la contribution du transport non spécifique à l'accumulation totale est aussi différente dans les deux milieux à pH 7.5 (32% vs 15% en milieu nitré et chloré dans les cellules H441 et respectivement 34% et 13% dans les cellules A549). Par ailleurs, les niveaux d'accumulation spécifiques mesurés à pH 5.5 en milieu NO_3^- et Cl^- ne varient que très peu dans les cellules H441 (11 vs 9 pmol de $^{109}\text{Cd}/\text{mg}$ de protéine) et A549 (13 vs 9 pmol de $^{109}\text{Cd}/\text{mg}$ de protéine).

Concernant l'effet du pH, il semble que le ^{109}Cd soit bien moins transporté à pH acide. Après soustraction des composantes respectives non spécifiques du transport, les pourcentages d'inhibition de transport spécifique, par rapport à pH 7.5, en milieux Cl^- , NO_3^- et DMEM, sont respectivement 16%, 8% et 26% pour les cellules H441 et 48%, 14% et 83% pour la lignée A549. Les tests statistiques indiquent que dans la lignée A549 il existe des différences significatives entre les niveaux d'accumulation du Cd à pH 5.5 et 7.5 dans chaque milieu, alors que dans les cellules H441, les différences ne sont pas statistiquement significatives sauf en milieu NO_3^- où le pourcentage d'inhibition du transport à pH acide (8%) est statistiquement significatif mais cette inhibition reste toutefois beaucoup plus faible à celle obtenue dans les cellules A549. En général, il semble donc que dans la lignée A549 le transport de ^{109}Cd soit plus sensible aux variations de pH que les cellules H441.

7.2.4 Interaction Cd-Ca

Afin de mieux caractériser le transport membranaire du Cd, nous avons étudié les interactions Cd-Ca. Nous avons vérifié dans quelle mesure la composante spécifique du transport de Cd, déterminée en ajoutant $100\ \mu\text{M}$ de Cd non radioactif, peut impliquer un transport de Ca en étudiant parallèlement le transport de ^{45}Ca et en menant des études de compétition croisée. Ceci a été aussi fait en condition dépolarisante en remplaçant le Na^+ externe par du potassium (K^+) afin de vérifier l'existence de transporteurs calciques dépendants du voltage (VDCC) et qui pourraient transporter le Cd. Les VDCC sont normalement fermés en conditions basales mais la dépolarisation cellulaire entraîne l'ouverture de ces canaux. Le temps d'exposition a été fixé à 5 min et ces expériences ont été menées en milieu nitré afin de favoriser la forme Cd^{2+} et donc les interactions Cd^{2+} et Ca^{2+} .

Tel que présenté à la figures 7.7 nos résultats montrent que, dans les deux lignées, le transport de Cd est inhibé en présence d'un excès de Cd non radioactif, ce qui nous permet, comme précédemment, de distinguer la composante spécifique de la composante non spécifique de transport (dans les deux lignées, environ 70% du transport total implique

un système de transport). Toutefois, en présence de 5 mM de Ca, que ce soit ou non en conditions dépolarisantes, les niveaux d'accumulation spécifique ne varient pas de façon significative. Il semble que le Ca n'inhibe pas le transport membranaire du Cd et que la composante spécifique du transport de Cd n'implique pas de VDCC puisque l'excès de K⁺ n'a aucun effet.

L'étude de l'accumulation du ⁴⁵Ca indique que les cellules A549 accumulent deux fois plus de Ca que les cellules H441 (1.2 ± 0.1 vs 0.6 ± 0.04 nmol/5 min/mg de protéines) (figure 7.8). La présence de 5 mM de Ca non radioactif diminue l'accumulation du ⁴⁵Ca de 67% dans les cellules A549 et de 55% dans les cellules H441 ce qui indique que le transport membranaire du Ca se fait parallèlement selon une diffusion simple et un système de transport spécifique. Les résultats montrent aussi que, dans les cellules A549 et H441, 100 μ M de Cd inhibe respectivement 58 % et 54% du transport spécifique de Ca. Un excès de K dans le milieu d'exposition entraîne une augmentation significative de 98% de l'accumulation spécifique du Ca dans la lignée A549 indiquant l'existence de VDCC qui contribuent à l'accumulation de Ca. Aussi, l'excès de Cd inhibe la totalité du transport de ⁴⁵Ca qui est stimulé par la dépolarisation. Selon ces résultats, il semble que le Cd n'emprunte pas des systèmes de transport calciques mais peut inhiber le transport de Ca à la fois en conditions basales et en condition dépolarisante dans les cellules A549. Aucune stimulation du transport de ⁴⁵Ca n'a été observée en conditions dépolarisante dans les cellules H441.

7.3 Interactions Cd-métaux toxiques

Afin de mieux caractériser les interactions possibles entre les métaux, les cellules ont été exposées à divers mélanges de métaux pris deux à deux ou en combinaisons multiples à leurs valeurs respectives de LC₅₀ afin de discriminer les effets toxiques antagonistes, additifs ou synergiques. Les résultats présentés à la figure 7.9 indiquent que, dans les deux lignées, un effet antagoniste du Pb est observé sur la toxicité du Cd. Le Hg et le Cd semble aussi avoir un effet antagoniste sur leur toxicité individuelle puisque de 12% à 25% de viabilité cellulaire persiste en présence d'un mélange de Hg-Cd pour lequel la concentration de chaque métal

induit seul plus de 50% de mortalité. Néanmoins, il est clair que l'effet d'une exposition au mélange Cd-Hg sur la viabilité des cellules est nettement plus grand que celui du Cd ou du Hg seul. Les tests statistiques indiquent que le Pb potentialise les effets du Hg dans les deux lignées alors qu'il semble avoir un effet antagoniste sur l'action du mélange Cd-Hg dans les cellules A549 seulement. Dans les cellules H441, le Pb potentialise les effets des combinaisons Cd-Hg puisqu'en présence de Pb, le mélange Cd-Hg induit une plus forte mortalité.

Une autre série d'expériences visant à déterminer l'effet d'un métal sur la courbe dose-réponse d'un autre métal ont été effectuées. Les résultats présentés à la figure 7.10 montrent que, dans les deux lignées, le Pb déplace la courbe de réponse cellulaire au Cd vers la droite augmentant ainsi la valeur de LC_{50} et donc la résistance au Cd. Dans les cellules H441, il aurait été intéressant d'augmenter la concentration du Cd au delà de 1000 μ M afin d'avoir plus de précision sur les valeurs de LC_{50} et du plateau de viabilité minimale (tableau 7.6). Donc, le Pb semble avoir un effet protecteur contre la cytotoxicité du Cd dans les deux lignées. En présence de Hg, aucune variation significative des paramètres de toxicité du Cd n'a été observée dans les cellules H441. Cependant, nos résultats suggèrent une forte sensibilisation des cellules A549 au Cd puisque le Hg diminue significativement la valeur de LC_{50} pour le Cd (déplacement de la courbe de réponse cellulaire vers la gauche).

Concernant l'effet du Pb et du Cd sur la courbe de réponse cellulaire au Hg, les résultats présentés à la figure 7.11 et dans le tableau 7.7 montrent que le Pb déplace légèrement la courbe de viabilité cellulaire vers la droite dans les cellules H441 uniquement, augmentant ainsi significativement la valeur de LC_{50} , alors que dans les cellules A549, les paramètres de toxicité de Hg ne varient pas significativement en présence du Pb. Ainsi, le Pb réduirait la toxicité du Hg uniquement dans les cellules H441. Dans les deux lignées, le Cd sensibilise les cellules au Hg en diminuant de moitié la valeur de LC_{50} dans les cellules A549 et du tiers dans les cellules H441.

Parallèlement à ces mesures de viabilité cellulaire, l'accumulation du ^{109}Cd a été étudiée dans les mêmes conditions d'exposition soit en absence et en présence de 150 μ M de

Hg et 300 μ M de Pb afin de vérifier l'existence de corrélation entre les niveaux d'exposition, les contenus cellulaires et le potentiel toxique. Les résultats présentés à la figure 7.12 montrent que le Pb inhibe fortement le transport membranaire du Cd dans les deux lignées, alors que le Hg augmente l'accumulation du ^{109}Cd dans les cellules A549 uniquement.

7.4 Liste des tableaux

Tableau 7.1 : Paramètres de toxicité du Cd à des concentrations variant de 0 à 800 μM dans les cellules A549 et de 0 à 1000 μM dans la lignée H441.

	A549	H441
Pente (% / μM)	-74 ± 6	-62 ± 5
Plateau (% viabilité)	14.2 ± 3.6	28 ± 2
LC ₅₀ (μM Cd)	63 ± 10	120 ± 11

Tableau 7.2 : Paramètres de toxicité du Hg à des concentrations variant de 0 à 500 μM dans les cellules A549 et H441

	A549	H441
Pente (% / μM)	-200 ± 56	-178 ± 61
Plateau (% viabilité)	7.8 ± 2.4	9.3 ± 4.2
LC ₅₀ (μM Hg)	158 ± 8	159 ± 15

Tableau 7.3 : Viabilité cellulaire en présence de Cd (15, 60 et 120 μM) mesurée en utilisant l'essai MTT et la méthode de cytométrie de flux (FACS).

	%viabilité	
	MTT	FACS
15 μM Cd	98%	98%
120 μM Cd	30%	17%
60 μM Cd	50%	52%

Tableau 7.4 : Paramètres d'accumulation maximale (A_{\max}) et minimales (A_0) du ^{109}Cd dans les cellules A549 et H441 en absence et en présence de 100 μM de Cd non radioactif. Les valeurs présentées dans le tableau ont été obtenues en utilisant l'équation 6.1.

	A_0 ($\text{pmol } ^{109}\text{Cd}/\text{protéine}$)		A_{\max} ($\text{pmol } ^{109}\text{Cd}/\text{protéine}$)	
	A549	H441	A549	H441
Contrôle	5.6 ± 0.9	7.4 ± 0.7	50 ± 2	14 ± 2
+100 μM Cd	1.7 ± 0.3	1.6 ± 0.2	3.9 ± 0.6	3.4 ± 0.5

Tableau 7.5 : Paramètres cinétiques de l'accumulation initiale (3 min) de ^{109}Cd (K_m , V_{\max} et K_d) en fonction de la spéciation inorganique (milieux chlorure et nitrate). Les valeurs présentées dans le tableau ont été obtenues en utilisant l'équation 6.2.

	V_{\max} ($\text{pmol}/3\text{min}/\text{mg}$ protéine)		K_m (μM)		K_d ($\text{pmol}/3\text{min}/\mu\text{M}/\text{mg}$ protéine)	
	A549	H441	A549	H441	A549	H441
Tampn Cl^-	100 ± 38	56 ± 15	4.5 ± 1.7	2.0 ± 0.6	7.3 ± 1.5	7.5 ± 1.0
Tampon NO_3^-	141 ± 49	57 ± 13	4.5 ± 1.6	2.3 ± 0.6	15.6 ± 1.9	15 ± 1

Tableau 7.6 : Paramètres de toxicité du Cd en présence de Hg et Pb ainsi que paramètres de toxicité du Hg en présence de Cd et Pb dans les cellules A549.

	A549					
	Cd	Cd-Hg	Cd-Pb	Hg	Hg-Cd	Hg-Pb
Pente (% /μM)	-74 ± 6	-92 ± 19	-95 ± 19	-200 ± 56	-88 ± 14	-278 ± 180
Plateau (% viabilité)	14 ± 3	14 ± 4	13 ± 8	7.8 ± 2.4	11 ± 5	65 ± 1
LC_{50} (μM)	63 ± 10	20 ± 4	161 ± 35	158 ± 8	75 ± 13.8	167 ± 9

Tableau 7.7 : Paramètres de toxicité du Cd en présence de Hg et Pb ainsi que paramètres de toxicité du Hg en présence de Cd et Pb dans les cellules H441.

	H441					
	Cd	Cd-Hg	Cd-Pb	Hg	Hg-Cd	Hg-Pb
Pente (% /μM)	-62 ± 5	-62 ± 5	-50 ± 4	-178 ± 61	-105 ± 14	-235 ± 19
Plateau (% viabilité)	28 ± 2	17 ± 7	7 ± 33	9.3 ± 4.2	9.4 ± 8.1	7.7 ± 5.8
LC_{50} (μM)	120 ± 11	195 ± 58	595 ± 800	159 ± 15	108 ± 47	209 ± 24

7.5 Liste des figures

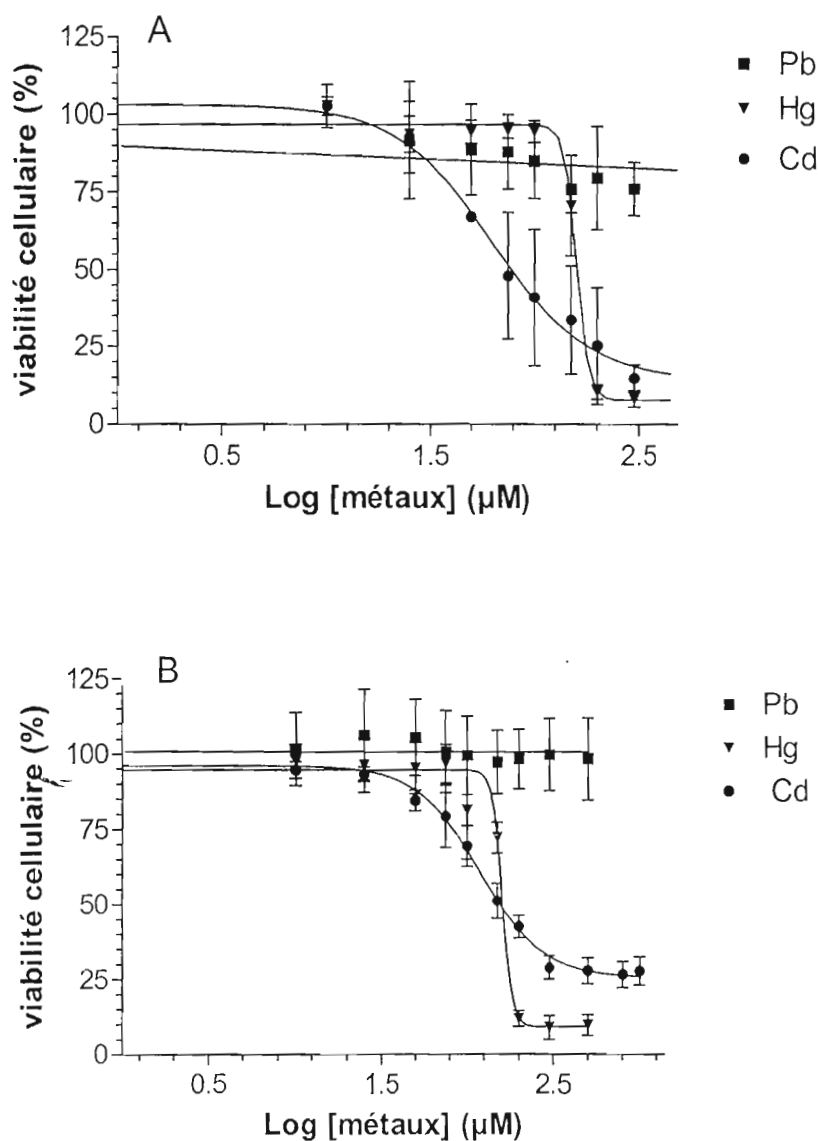


Figure 7.1 : Viabilité cellulaire en fonction de concentrations croissantes de Cd, de Pb et de Hg dans les cellules A549 (A) et H441 (B) cultivées dans des plaques à 96 puits pendant respectivement 14 et 9 jours. Les cellules ont été ensuite exposées pendant 24 h à des concentrations croissantes de Hg ou de Pb (0 à 500 μM) et de Cd (0 à 800 μM dans les A549 ; 0 à 1000 μM dans les H441) ajoutées au milieu de culture sans sérum. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle (0 μM de métaux). Les valeurs sont les moyennes ± écarts types de trois expériences indépendantes

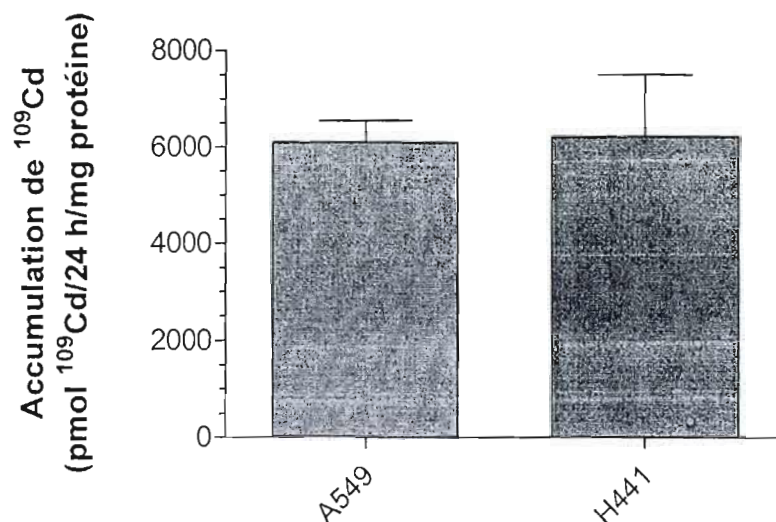


Figure 7.2 : Accumulation (24 h) de $0.3 \mu\text{M}$ ^{109}Cd dans les cellules A549 et H441 cultivées dans des pétris de 35 mm de diamètre pendant respectivement 14 et 9 jours. Les cellules ont été ensuite exposées à $0.3 \mu\text{M}$ de ^{109}Cd en milieu de culture sans sérum pendant 24 h. Dans les graphiques, les barres représentent les valeurs moyennes \pm écarts types de deux expériences indépendantes.

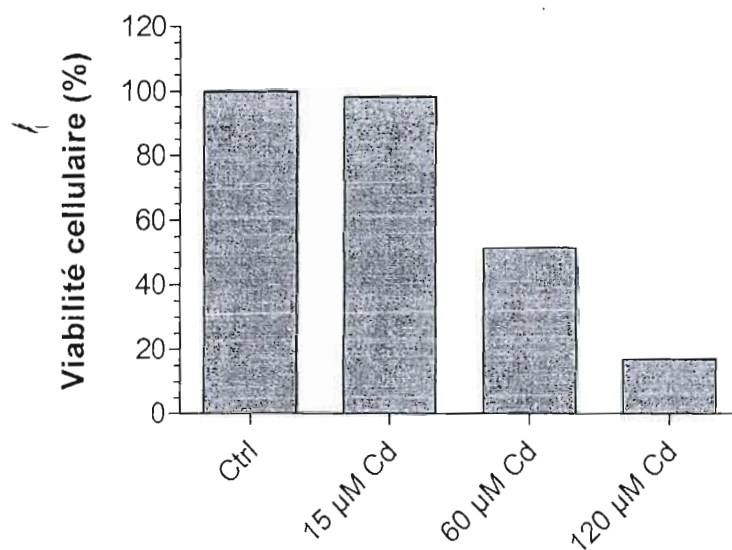


Figure 7.3 : Viabilité cellulaire en présence de Cd mesurée par la méthode de cytométrie de flux (FACS) dans les cellules A549 cultivées pendant 14 jours. Les cellules ont été ensuite exposées pendant 24 h en milieu de culture sans sérum à trois concentrations différentes de Cd : 15, 60 et $120 \mu\text{M}$. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle ($0 \mu\text{M}$ de Cd). Les barres représentent les résultats d'une expérience.

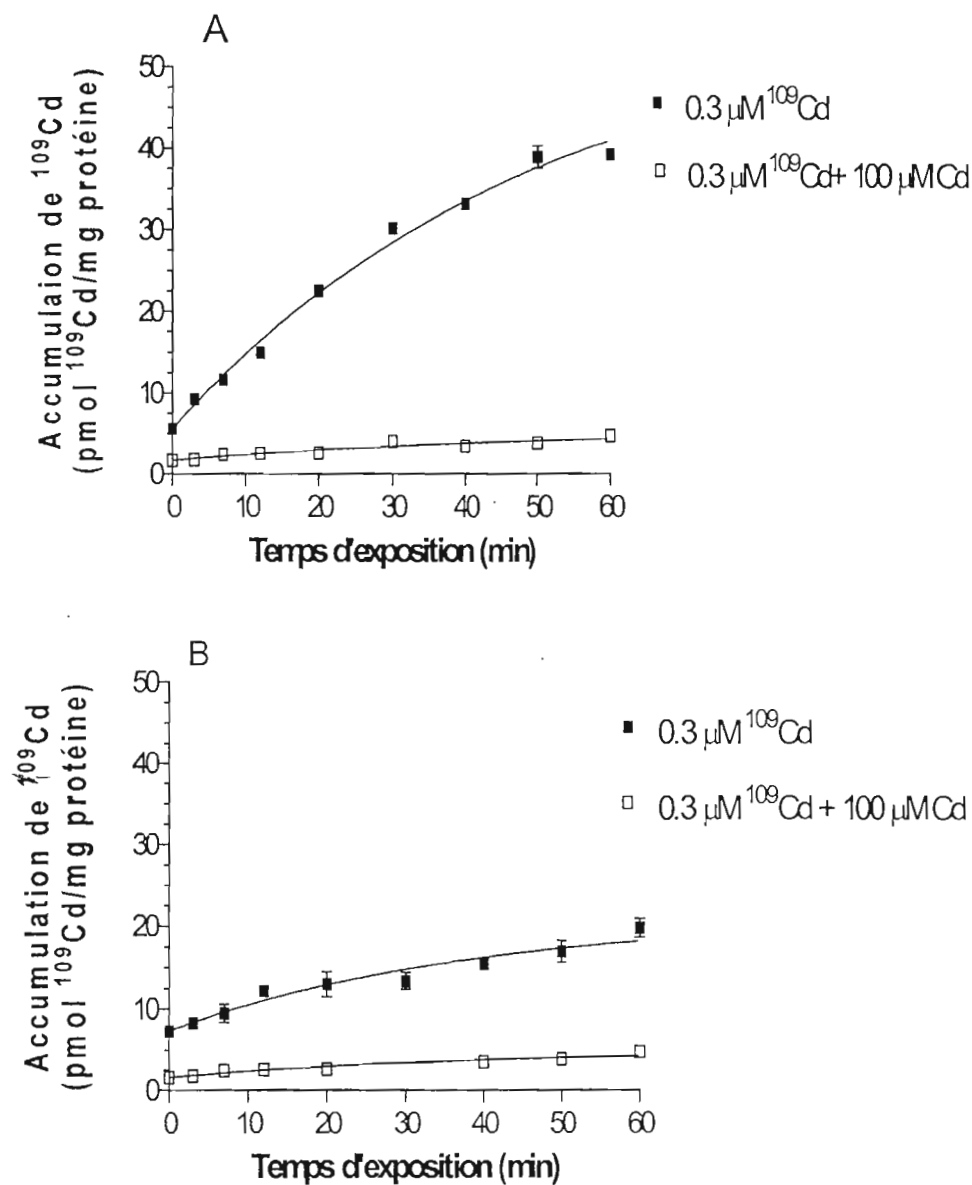


Figure 7.4 : Accumulation temporelle de ^{109}Cd dans les cellules A549 (A) et H441 (B) cultivées dans des pétris de 35 mm de diamètre pendant respectivement 14 et 9 jours. Les cellules ont été ensuite exposées à $0.3 \mu\text{M}$ de ^{109}Cd en milieu chlorure, en absence et en présence de $100 \mu\text{M}$ de Cd non-radioactif pendant des temps d'exposition variant de 3 à 60 min. Les valeurs sont les moyennes \pm écarts types de deux (A) et trois (B) expériences indépendantes.

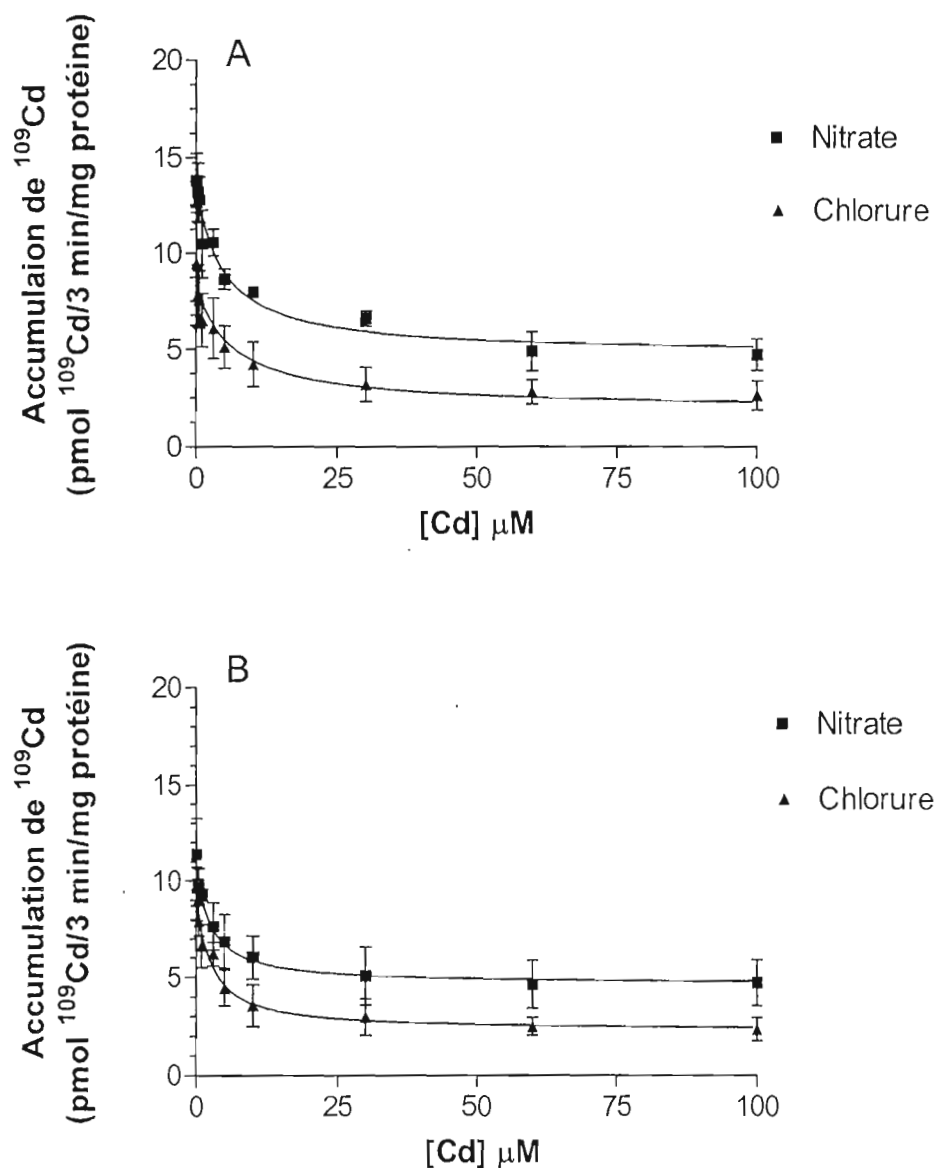


Figure 7.5 : Détermination des paramètres cinétiques du transport de ^{109}Cd en fonction de la spéciation inorganique dans les cellules A549 (A) et H441 (B) cultivées dans des pétris de 35 mm de diamètre pendant respectivement 14 et 9 jours. Les cellules ont été ensuite exposées à $0.3 \mu\text{M}$ de ^{109}Cd en milieu chlorure et nitrate en présence de concentrations croissantes de Cd non radioactif variant de 0 à $100 \mu\text{M}$ pendant 3 min. Les valeurs sont les moyennes \pm écarts types de trois expériences indépendantes.

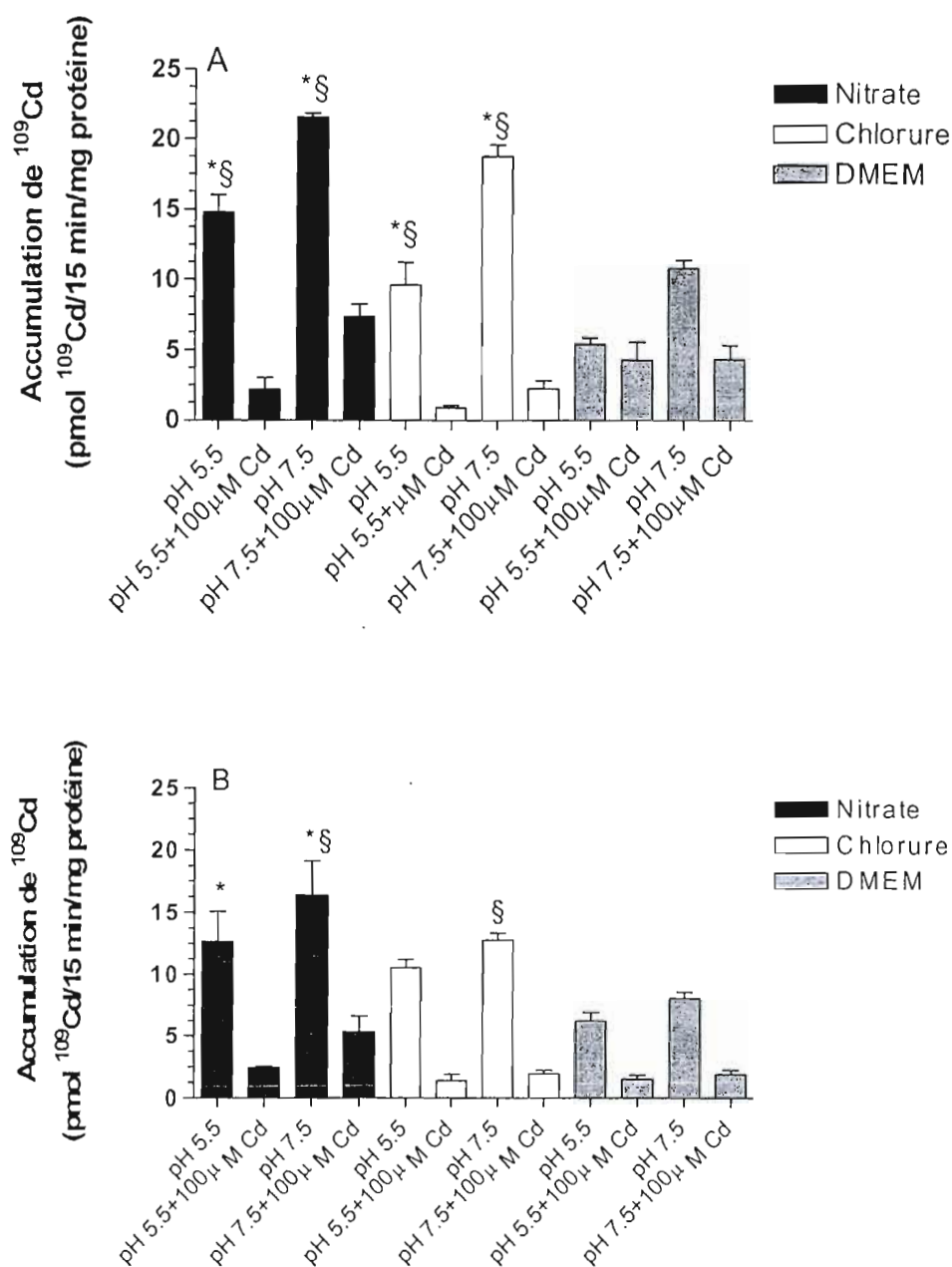


Figure 7.6 : Accumulation de ^{109}Cd en fonction de la spéciation organique et inorganique et en fonction du pH dans les cellules A549 (A) et H441 (B) cultivées dans des pétris de 35 mm de diamètre pendant respectivement 14 et 9 jours. Les cellules ont été ensuite exposées à $0.3 \mu\text{M}$ de ^{109}Cd en milieu chlorure, nitrate et DMEM (milieu de culture sans sérum) en absence et en présence de $100 \mu\text{M}$ de Cd non radioactif et à différents pH (5.5 et 7.5) pendant 15 min. Les barres représentent les valeurs moyennes \pm écarts types de trois expériences indépendantes. Le test Tukey est utilisé pour comparer, dans chaque milieu, les conditions qui sont significativement différentes (*) par rapport au pH (7.5 vs 5.5) et aussi pour comparer au même pH si les valeurs sont significativement différentes (§) entre le milieu Cl^- et NO_3^- .

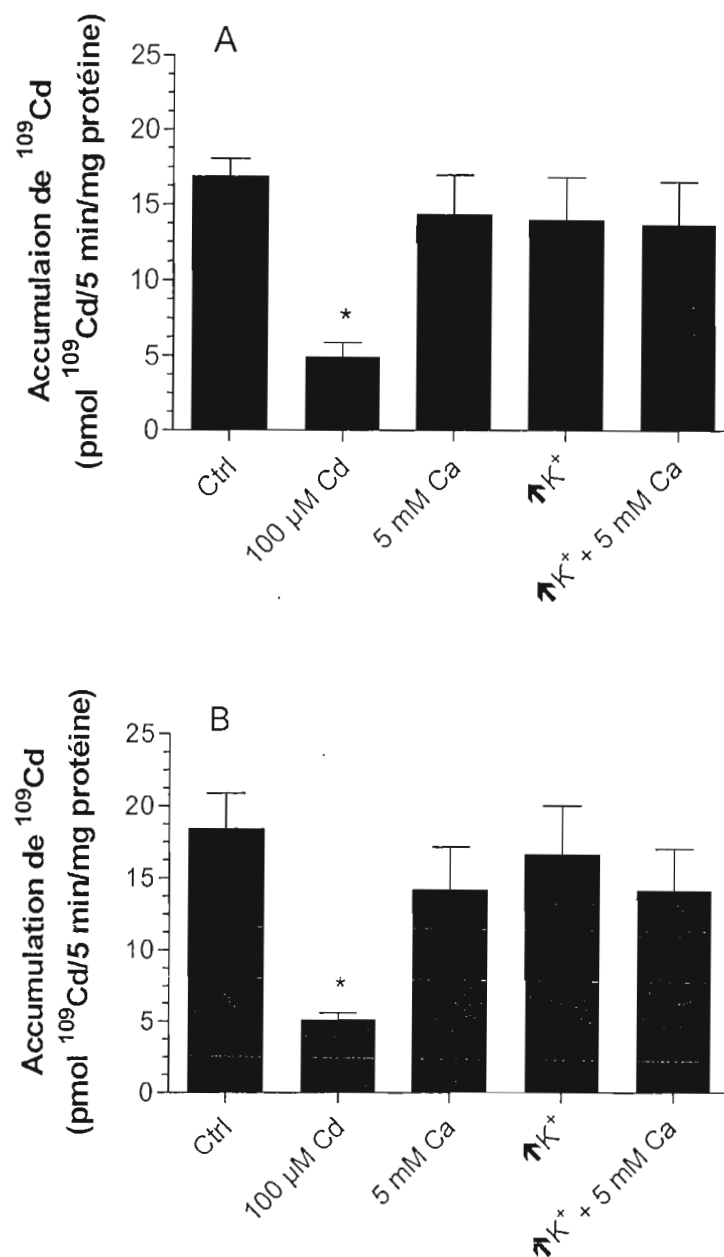


Figure 7.7 : Accumulation de ^{109}Cd en conditions basales et dépolarisantes dans les cellules A549 (A) et H441 (B) cultivées dans des p  t  ris de 35 mm de diamètre pendant respectivement 14 et 9 jours. Les cellules ont été ensuite exposées à 0.3 μM de ^{109}Cd en milieu nitrate en absence et en présence de 100 μM de Cd non radioactif ou de 5 mM de Ca en conditions basales (concentrations standards de K^+) et en conditions dépolarisantes (excès de K^+) pendant 5 min. Les barres représentent les valeurs moyennes \pm écarts types de trois expériences indépendantes. * représente les conditions qui sont significativement différentes par rapport au contrôle selon le test Dunnet à comparaison multiple ($p < 0.05$).

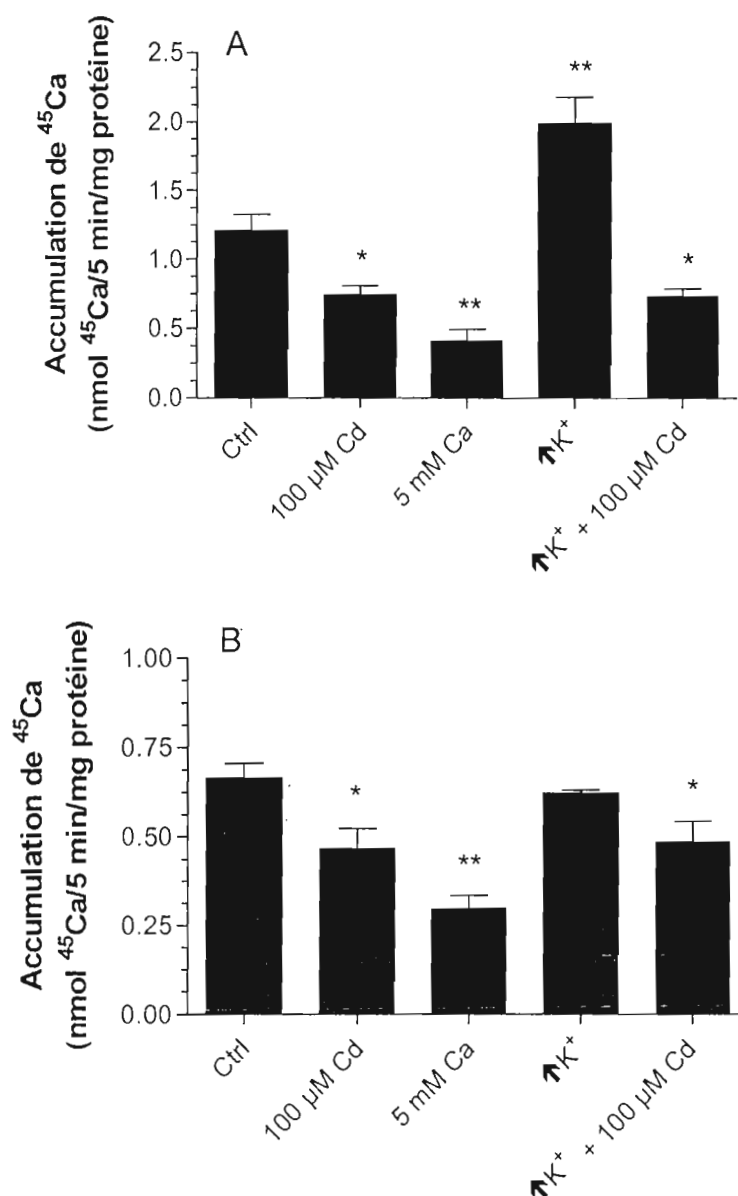


Figure 7.8 : Accumulation de ^{45}Ca en conditions basales et dépolarisantes dans les cellules A549 (A) et H441 (B) cultivées dans des p  tr  s de 35 mm de diamètre pendant respectivement 14 et 9 jours. Les cellules ont été ensuite exposées à 2.5 mM de ^{45}Ca en milieu nitrate en absence et en présence de 100 μM de Cd non radioactif et 5 mM de Ca en conditions basales (concentrations standards de K^+) et en conditions dépolarisantes (excès de K^+) pendant 5 min. Dans les graphiques, les barres représentent les moyennes \pm écarts types de trois expériences indépendantes. * et ** représentent les conditions qui sont significativement différentes par rapport au contrôle selon le test Dunnet à comparaison multiple (* $p < 0.05$ et ** $p < 0.01$)

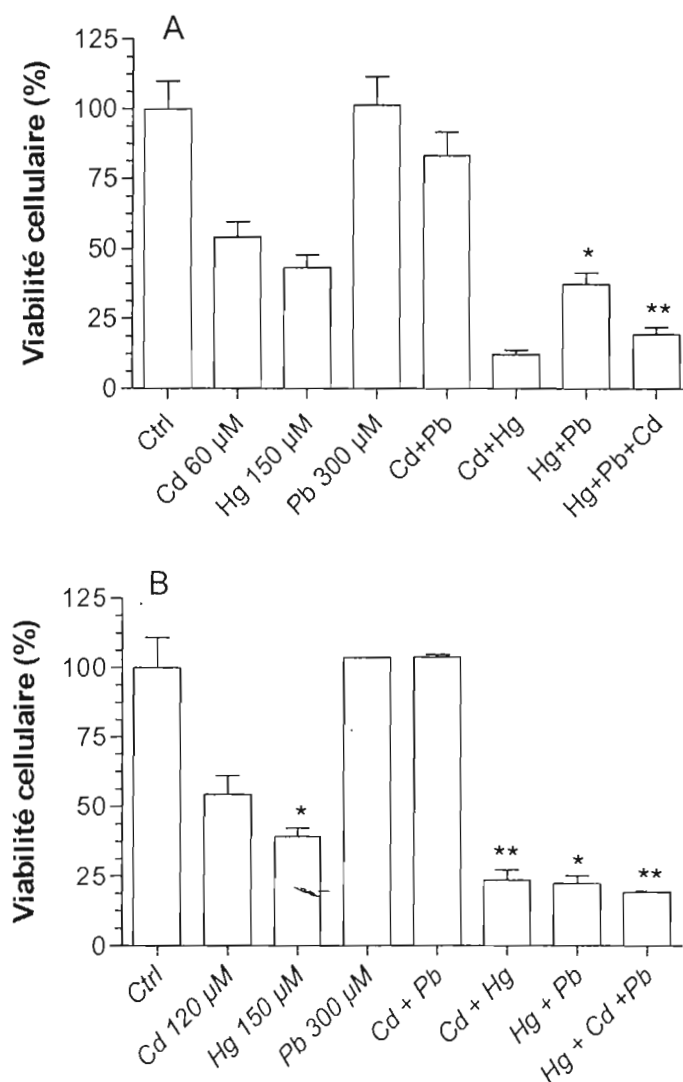


Figure 7.9 : Viabilité cellulaire en présence de Cd, de Pb et de Hg (utilisés à leurs valeurs de LC_{50}) seuls, pris deux à deux ou en combinaison multiple dans les cellules A549 (A) et H441 (B) cultivées dans des plaques à 96 puits pendant respectivement 14 et 9 jours. Les cellules ont été ensuite exposées pendant 24 h au Cd (A : 60 μ M ; B : 120 μ M), au Pb (A et B : 300 μ M) et au Hg (A et B : 150 μ M) ainsi qu'au mélange de ces métaux : Cd-Pb, Cd-Hg, Hg-Pb et Hg-Cd-Pb (utilisés à ces mêmes concentrations) ajoutées au milieu de culture sans sérum. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle (0 μ M de métaux). Les histogrammes représentent les valeurs moyennes \pm écart sur la moyenne de deux expériences indépendantes. Le test Kruskal Wallis est utilisé afin de vérifier l'existence de différences statistiques entre la condition Hg seul et Hg+Pb d'une part (*) et entre la condition Cd+Hg et Hg+Cd+Pb d'autre part (). (* $p < 0.05$)**

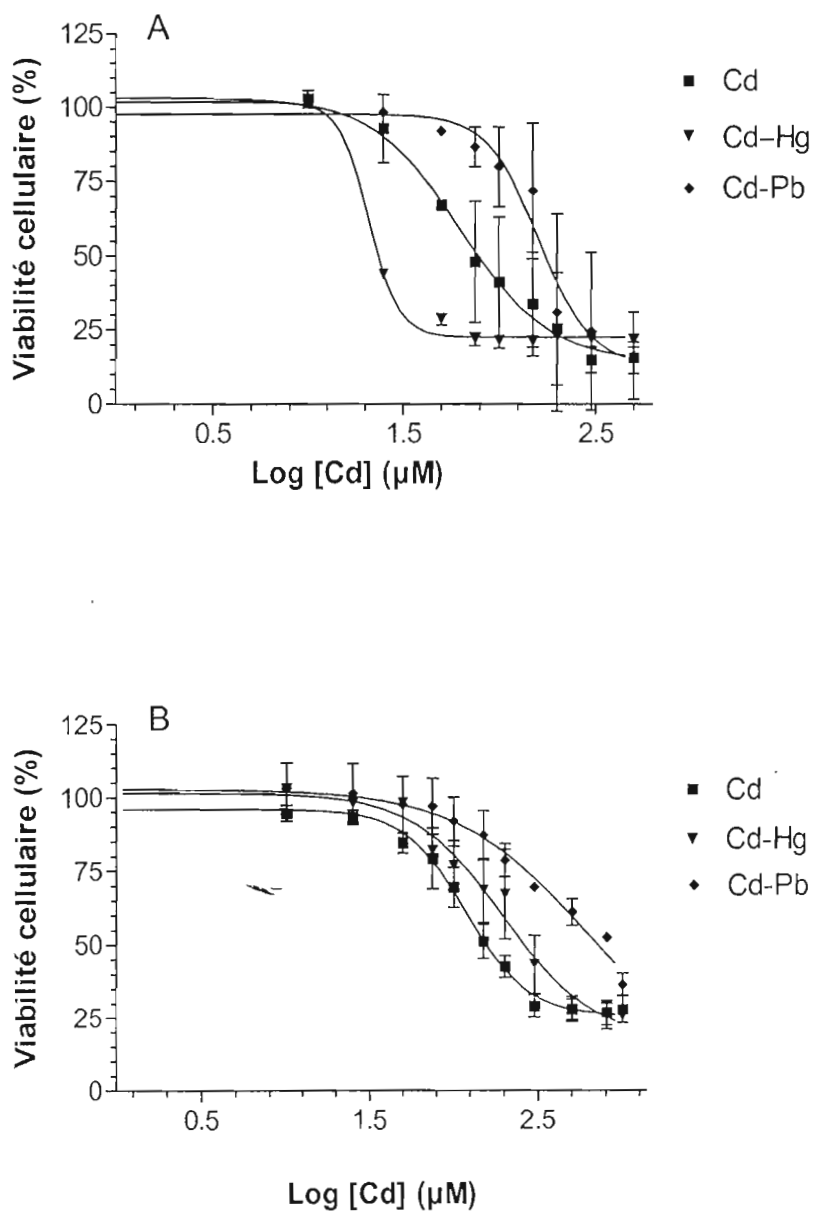


Figure 7.10 : Viabilité cellulaire en fonction de concentrations croissantes de Cd en absence et en présence de Hg et de Pb dans les cellules A549 (A) et H441 (B) cultivées dans des plaques à 96 puits pendant respectivement 14 et 9 jours. Les cellules ont été ensuite exposées pendant 24 h au Cd (A : 0 à 500 μM, B; 0 à 1000 μM) en absence et en présence de 150 μM de Hg et 300 μM de Pb ajoutées au milieu de culture sans sérum. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle (0 μM de métaux). Les valeurs sont les moyennes \pm écarts types de deux expériences indépendantes.

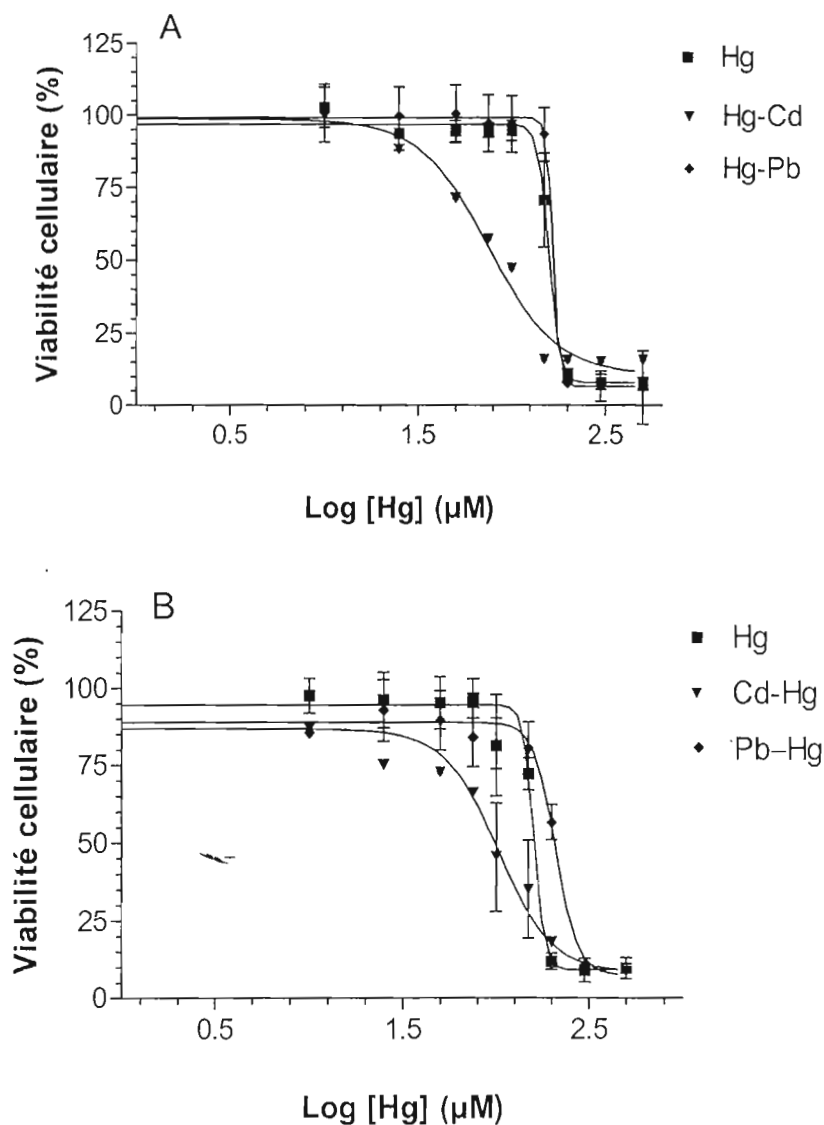


Figure 7.11 : Viabilité cellulaire en fonction de concentrations croissantes de Hg en absence et en présence de Cd et de Pb dans les cellules A549 (A) et H441 (B) cultivées dans des plaques à 96 pendant respectivement 14 et 9 jours. Les cellules ont été ensuite exposées pendant 24 h au Hg (0 à 500 μM) en absence et en présence de Cd (A : 60 μM; B : 120 μM) et de Pb (300 μM) ajoutées au milieu de culture sans sérum. Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire en fonction du contrôle (0 μM de métaux). Les valeurs sont les moyennes ± écarts types de deux expériences indépendantes.

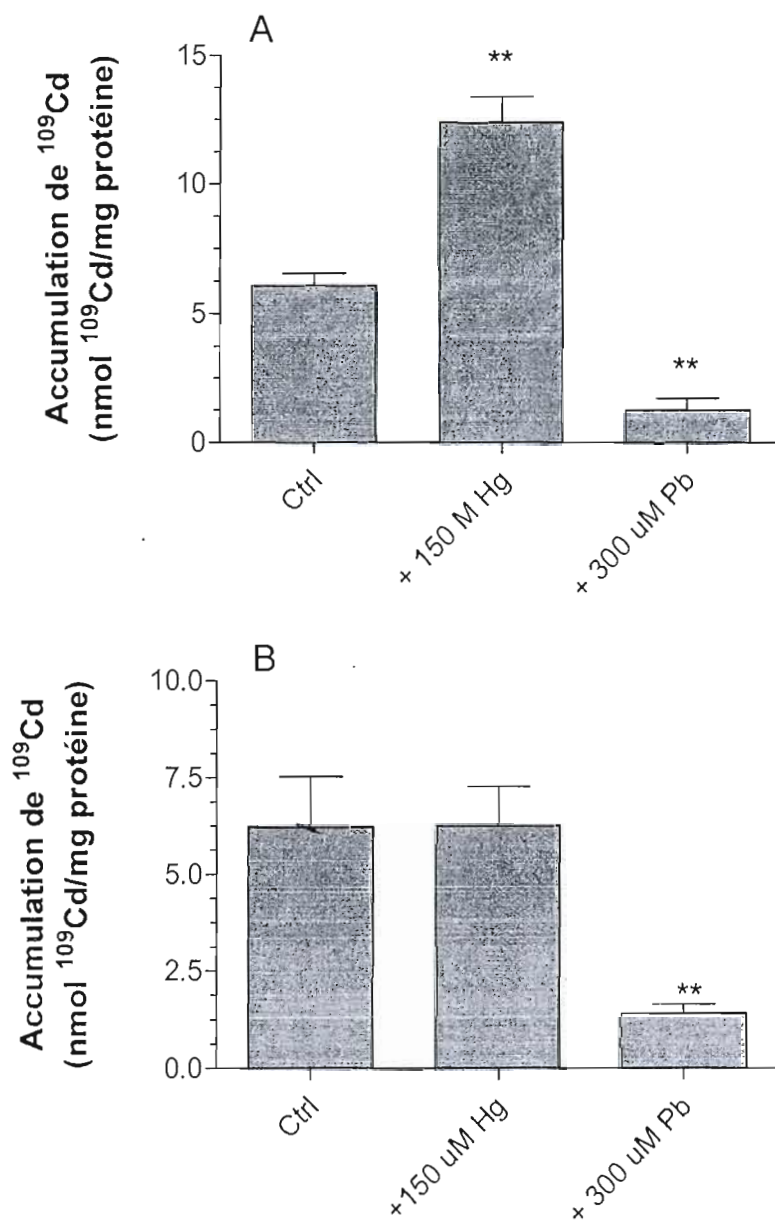


Figure 7.12 : Accumulation (24 h) de $0.3 \mu\text{M}$ ^{109}Cd en absence et en présence de Pb et de Hg (utilisé à leur valeur de LC_{50}) dans les cellules A549 (A) et H441 (B) cultivées dans des pétris de 35 mm de diamètre pendant respectivement 14 et 9 jours. Les cellules ont été ensuite exposées à $0.3 \mu\text{M}$ de ^{109}Cd en milieu de culture sans sérum en absence et en présence de $150 \mu\text{M}$ de Hg et $300 \mu\text{M}$ de Pb pendant 24 h. Les barres représentent les valeurs moyennes \pm écarts types de deux expériences indépendantes. ** représente les conditions qui sont significativement différentes par rapport au contrôle selon le test Dunnet à comparaison multiple (** $p < 0.01$).

CHAPITRE VIII

DISCUSSION

8.1 Cytotoxicité et accumulation du ^{109}Cd

Le Cd fait parti des métaux lourds préoccupants pour la santé. Dans notre projet, la toxicité de ce métal a été évaluée sur les cellules A549 et H441 en utilisant le test de viabilité cellulaire MTT (validé par la méthode de FACS pour assurer la fiabilité des résultats). Les résultats montrent que le Cd est cytotoxique dans les deux lignées et que la lignée A549, pour laquelle une plus faible valeur de LC_{50} a été mesurée ($63\ \mu\text{M}$ vs $120\ \mu\text{M}$), est deux fois plus sensible que la lignée H441. Des essais de cytotoxicité effectués sur d'autres lignées cellulaires indiquent aussi des différences de sensibilité au Cd en fonction du phénotype cellulaire. Une valeur de LC_{50} de $5\ \mu\text{M}$ a été obtenue dans les cellules bronchiolaires humaines (BEAS-2B) (Schmid *et al.*, 2007) alors que dans les cellules ostéoblastiques MG-63 la valeur de LC_{50} est de $15\ \mu\text{M}$ (Levesque *et al.*, 2008). Toutefois, Olabarrieta *et al.* (2001) ont obtenu, après 24h d'exposition, une valeur de LC_{50} de $60\ \mu\text{M}$ dans les cellules du tubule rénal proximal (LLC-PK1) comparable à celle obtenue dans notre étude sur la lignée A549.

Les études d'accumulation cellulaire du ^{109}Cd , effectuées dans les mêmes conditions d'exposition que pour les mesures de toxicité, indiquent que la différence de sensibilité entre les lignées H441 et A549 ne semble pas être liée à une plus grande accumulation du Cd mais plutôt à d'autres mécanismes cellulaires qui protégeraient mieux les cellules H441 contre la

cytotoxicité du Cd. Il aurait donc été intéressant d'étudier trois mécanismes de protection bien connus contre la cytotoxicité du Cd et qui seraient probablement responsables des variations de sensibilité observées dans les cellules A549 et H441. Il s'agit de la protection offerte par le GSH, la MT et les protéines de choc thermiques (HSP70). Plusieurs études ont montré que le Cd est un inducteur de stress oxydatif qui réduit la défense antioxydante dans la cellule en se liant au GSH. Sous forme réduite, le GSH est considéré comme étant l'antioxydant majeur qui protège les cellules contre les radicaux libres (dérivés actifs de l'oxygène). Il serait donc intéressant de comparer la capacité antioxydante dans les cellules A549 et H441 en vérifiant par exemple si l'expression de GSH peut varier après exposition au Cd. Le rôle du GSH dans la cytoprotection contre le Cd a déjà été caractérisé dans plusieurs études (Kang et Enger, 1990; Gregus et Klaassen, 1996). La MT est aussi reconnue pour son effet protecteur contre la cytotoxicité du Cd. C'est une protéine riche en cystéines ayant une grande affinité de liaison pour les métaux lourds. Des études antérieures ont montré que l'exposition au Cd augmente l'expression des gènes codant pour la MT (Kusakabe *et al.*, 2008) qui est capable de lier le Cd et donc de protéger les cellules contre les effets délétères de ce métal toxique (Klaassen *et al.*, 1999). Finalement, il est aussi possible que les niveaux d'induction des protéines de stress telles que l'HSP70 (induite par le choc thermique, le stress oxydatif et après exposition aux métaux lourds) varient d'une lignée à l'autre suite à une exposition au Cd. Différentes études ont indiqué que l'expression de l'HSP70 peut augmenter après exposition au Cd (Urani *et al.* 2007; Valbonesi *et al.*, 2008; Kusakabe *et al.*, 2008). Il semble donc que la HSP70 joue un rôle important dans les mécanismes de défense contre la toxicité du Cd. Outre, le fait que différentes capacités d'induction soient possibles, de plus faibles niveaux constitutifs de GSH ou de MT peuvent aussi être à l'origine de la plus grande sensibilité des cellules A549.

8.2 Cytotoxicité du Hg et du Pb

Dans notre projet, nous avons aussi évalué la toxicité du Hg et du Pb. Il semble que le Pb n'affecte pas la viabilité des cellules A549 et H441 dans nos conditions expérimentales à 500 μM de Pb. En effet, des études *in vivo* réalisées sur la truite arc-en-ciel ont démontré une valeur de LC_{50} de 482 μM (Birceanu *et al.*, 2008). Aussi, une valeur de LC_{50} de 3.14 mM

a été obtenue dans des cellules lymphocytaires humaines (Pasha *et al.*, 2006) ce qui est très élevé. Si le Pb n'affecte pas la viabilité cellulaire, il peut par contre endommager certaines structures cellulaires telles que l'ADN. Ceci a déjà été démontré en exposant des cellules lymphocytaires humaines au Pb (Pasha *et al.*, 2006). Il s'avèrerait donc pertinent d'étudier l'effet génotoxique du Pb dans les cellules A549 et H441. La relation entre la toxicité potentielle du Pb et les contenus cellulaires en MT, en GSH et l'induction de HSP70 n'a pas été exploré dans notre étude. Tout comme pour le Cd et le Hg, même si le Pb n'a induit aucune mortalité, il serait tout aussi pertinent d'étudier les niveaux d'induction de ces protéines et peptides comme possible mécanismes de protection contre le Pb.

Contrairement au Pb, les courbes de viabilité cellulaire en réponse au Hg indiquent que ce métal est cytotoxique dans les cellules A549 et H441 et que le potentiel de toxicité du Hg ne varient pas d'une lignée à l'autre ($LC_{50} \approx 158 \mu M$). Des études *in vivo* effectuées sur la truite arc-en-ciel indiquent une valeur de LC_{50} de $162 \mu M$ après 24 h d'exposition au Hg (Valenti *et al.*, 2005) alors qu'une valeur de LC_{50} de $0.6 \mu M$ est obtenue après exposition de cellules embryonnaires de grenouille en utilisant un test de tératogénicité (FETAX) (Prati *et al.*, 2002). Toutefois, d'autres études de cytotoxicité réalisées sur des cellules rénales (mIMCD3) indiquent une valeur de LC_{50} de $40 \mu M$ après 24h d'exposition (Park *et al.*, 2007)

Comme décrit précédemment, la sensibilité des cellules au Cd semble varier d'une lignée à l'autre et les cellules A549 sont deux fois plus sensibles au Cd que les cellules H441. Toutefois, en comparant les pentes des courbes de viabilité cellulaire en réponse au Cd et au Hg, il apparaît que dans les deux lignées, le Hg agit sur un plus petit intervalle de concentrations pour induire le même taux de mortalité maximal comparativement au Cd. Les valeurs de LC_{50} du Cd et du Hg sont sensiblement les mêmes dans les cellules H441 alors que les cellules A549 semblent être plus sensibles au Cd qu'au Hg.

8.3 Accumulation temporelle du ^{109}Cd

Les mécanismes régissant le transport membranaire du Cd sont peu connus. Des études antérieures effectuées sur la lignée A549 ont montré que ces cellules accumulent rapidement le Cd (Hatcher *et al.*, 1995; Croute *et al.*, 2000; Jumarie, 2002). Nos résultats démontrent aussi que le Cd est rapidement accumulé dans les cellules A549 et H441. Il est aussi intéressant de constater que l'inhibition importante de l'accumulation cellulaire du ^{109}Cd en présence d'un excès de Cd non radioactif dans les cellules A549 et H441 indique que le transport membranaire du Cd implique un système de transport spécifique en plus de la diffusion passive. En effet, il a été démontré que le Cd emprunte des systèmes de transport spécifiques dans les cultures primaires de cellules alvéolaires de type II de rat et les cellules A549 (Jumarie, 2002) tout comme dans les cellules entérocytaires TC7 (Jumarie *et al.*, 1997), les cellules intestinales HIEC (Bergeron et Jumarie, 2006) et les cellules ostéoblastiques MG-63 (Levesque *et al.*, 2008).

8.4 Paramètres cinétiques de transport du Cd

Les paramètres cinétiques du transport (K_m et V_{max}) diffèrent d'une lignée à l'autre et ne semblent pas être influencés par la spéciation inorganique, indiquant l'implication probable, pour le Cd^{2+} et les chloro-complexes CdCl_n^{2-n} , de systèmes spécifiques de transport ayant des valeurs de K_m voisines et qu'il est expérimentalement difficile de discriminer. Les valeurs de V_{max} et K_m sont deux fois supérieures dans les A549 que dans les H441. La valeur de K_m obtenue en milieu chlorure pour les cellules A549 ($4.5 \pm 1.7 \mu\text{M}$) ne varie que très peu de celle obtenue par Jumarie (2002) sur la même lignée ($6.4 \pm 1.3 \mu\text{M}$) et par Bergeron et Jumarie (2006) dans les cellules intestinales HIEC ($5.0 \pm 1.6 \mu\text{M}$). Aussi, la valeur de K_m obtenue dans les H441 ($2.0 \pm 0.6 \mu\text{M}$) ne varie que très peu de celle obtenue par Jumarie *et al.* (1997) dans les cellules intestinales Caco-2 ($3.8 \pm 0.7 \mu\text{M}$). Même si nos résultats indiquent que les valeurs de K_m varient significativement entre les cellules A549 et H441, en comparant ces valeurs avec celles obtenues dans d'autres lignées, il est clair qu'en général l'affinité du transport de Cd est similaire dans plusieurs phénotypes cellulaires très distincts. Les résultats démontrent aussi que la concentration de traceur utilisé dans notre étude (0.3

μM) n'est pas saturante pour les sites de transport membranaire puisqu'un K_m inférieur à $5 \mu\text{M}$ a été mesuré dans les deux lignées A549 et H441.

On peut considérer que la fraction non spécifique du ^{109}Cd accumulé varie en fonction de la spéciation inorganique et non selon le phénotype cellulaire. Normalement, le transport non spécifique ne devrait pas changer en fonction des milieux d'exposition (Elisma et Jumarie, 2001). Il est donc surprenant que la valeur de K_d en milieu NO_3^- (où la majorité du Cd se trouve sous forme d'ions libre qui est rarement transporté par diffusion passive) soit deux fois supérieure qu'en milieu Cl. La figure 7.6 indique aussi qu'à pH 7.5 la composante non spécifique du transport de ^{109}Cd est plus importante en milieu NO_3^- qu'en milieu Cl⁻. Ceci a été déjà observé dans des études antérieures dans les cellules HIEC (Jumarie et Bergeron, 2006) et la lignée MG-63 (Levesque *et al.*, 2008) mais sans que cela n'affecte la contribution du transport non spécifique à l'accumulation totale. Toutefois, nos résultats démontrent que dans les deux lignées cette contribution varie d'un milieu à l'autre, seuls les niveaux (pmol/mg protéine) ne varient que très peu.

8.5 L'effet du pH et de la spéciation organique et inorganique

La compétition entre une faible concentration de traceur ($0.3 \mu\text{M}$) et un excès de Cd non radioactif ($100 \mu\text{M}$) pour des structures membranaires spécifiques provoque une forte réduction de l'accumulation du traceur. Cependant, dans le milieu DMEM et à pH acide, les niveaux d'accumulation de ^{109}Cd en absence et en présence d'excès de Cd non radioactif ne varient pas significativement dans les cellules A549. Cette surprenante observation peut s'expliquer par une différence dans le transport de formes organiques du Cd dans les deux lignées : ce transport se ferait essentiellement par diffusion passive dans les cellules A549 alors qu'il impliquerait des systèmes saturables dans les cellules H441.

Dans les deux lignées, la différence entre les niveaux d'accumulation du Cd mesurés à pH 5.5 et pH 7.5 indique que le Cd est bien moins transporté à pH acide. Donc, il est clair que le transporteur de Fe NRAMP2, nécessitant un gradient de protons H^+ (pH acide) pour son fonctionnement, n'est pas impliqué dans le transport de Cd comme cela semble l'être

dans les cellules entérocytaires (Elisma et Jumarie, 2001). Il est aussi intéressant de noter que le transport de ^{109}Cd est plus sensible aux variations de pH dans la lignée A549 que dans les cellules H441. Cette sensibilité au pH peut s'expliquer par la présence d'un système de transport médié plus efficace à pH 7.5 qu'à pH 5.5 dans les cellules A549. Par conséquent, l'accumulation du Cd se trouve sensiblement réduite à pH 5.5 qu'à pH 7.5.

Ainsi, il semble que la spéciation organique et inorganique influent sur le transport membranaire du Cd dont l'accumulation serait plus importante en milieux inorganiques (chloré et nitré) qu'en milieux organiques (DMEM). Nous savons que certains acides aminés présents dans le milieu DMEM sont capables de se lier au Cd. Il s'agit d'une forte complexation organique qui pourrait expliquer la diminution des niveaux d'accumulation du Cd en milieu DMEM par rapport aux milieux inorganiques. En effet, différentes études ont montré que les formes organiques de Cd sont transportées moins rapidement que les formes inorganiques (Moberg, 1993; Berglund *et al.*, 1994). Les résultats indiquent aussi qu'à même pH, l'accumulation de Cd est légèrement plus importante en milieu NO_3^- qu'en milieu Cl^- . Toutefois, l'augmentation de l'accumulation spécifique observée en milieu NO_3^- est beaucoup plus faible que l'augmentation des concentrations de Cd^{2+} . Il semble donc, tel qu'observé dans les cellules TC7 (Jumarie et al. 2001) et HIEC (Bergeron et Jumarie, 2006), que l'accumulation de Cd ne dépend pas seulement de l'ion libre; des chlorocomplexes participeraient aussi au transport membranaire. Aussi, il est hypothétiquement possible que des systèmes spécifiques ayant une grande affinité pour le Cd^{2+} soient saturés à la concentration de ^{109}Cd utilisée dans nos études ($0.3\ \mu\text{M} \times 80\%$ soit $240\ \text{nM}$). Or, l'estimation des paramètres cinétiques de transport indiquent que la concentration de traceur utilisée ($0.3\ \mu\text{M}$) ne semble pas être saturante étant donné que les valeurs de K_m obtenues pour les cellules A549 et H441 dépassent largement cette concentration. Néanmoins, $0.3\ \mu\text{M}$ est la concentration de Cd totale, toutes espèces confondues, et il demeure possible que même en milieu nitraté, le transport attribuable à $240\ \text{nM}$ de Cd^{2+} soit saturé auquel cas le transport de l'ion libre se ferait à très haute affinité, soit à valeur de K_m beaucoup trop faible pour être discriminée en présence d'autres systèmes à plus faibles affinités transportant d'autres espèces chimiques de Cd.

8.6 Interaction Cd-Ca :

Au niveau cellulaire, la membrane plasmique forme la première barrière contre l'accumulation intracellulaire de différents toxiques. L'absorption des métaux impliquant un passage au travers d'un épithélium peut se faire par une diffusion simple, comme elle peut emprunter des mécanismes spécifiques. Comme la présence de systèmes de transport spécifiquement dédiés aux métaux toxiques est improbable, il est généralement admis que les métaux non essentiels comme le Cd peuvent utiliser le transport spécifique de métaux essentiels comme le Ca (Baker *et al.*, 2003). Nos résultats démontrent que les niveaux d'accumulation du ^{109}Cd ne varient pas significativement entre les deux lignées sur des temps courts (5 minutes), soit en fonction de ces phénotypes pulmonaires, alors que le ^{45}Ca est deux fois plus transporté dans les cellules A549 que dans les cellules H441. Dans les deux lignées, comme dans le cas du Cd, l'accumulation du Ca implique un système spécifique de transport. Le transport de Cd demeure insensible aux conditions dépolarisantes, il semble donc que la composante spécifique du transport de Cd n'implique pas de VDCC même s'il existe, dans les cellules A549, un transport de Ca dépendant du voltage. En effet, nos résultats montrent clairement une stimulation du transport de Ca en excès de K^+ extracellulaire produisant généralement une dépolarisation membranaire. Par ailleurs, des études antérieures effectuées sur les cellules A549 ont démontré l'existence de canaux potassiques BK-Ca- activés par le voltage et par liaison d'ion Ca^{2+} sur leur extrémité intracellulaire (Sofija *et al.*, 2003) et qui sont dans la plupart du temps couplés à des canaux Ca^{2+} dépendants du voltage (Ca_v), résultat qui justifie la probabilité d'un lien moléculaire BKCa- Ca_v dans les cellules A549 comme cela a déjà été démontré dans des cellules nerveuses (Berkefeld *et al.*, 2006 ; Henrike *et al.*, 2006).

Par ailleurs, le Cd inhibe le transport de ^{45}Ca alors que le Ca n'inhibe pas l'accumulation de ^{109}Cd . Cette observation peut s'expliquer par une grande affinité du Cd pour des systèmes de transport calciques sans que ceux-ci ne participent au transport membranaire du Cd (blocage des canaux calciques). Il reste également la possibilité que le

transport de Cd implique des canaux ou transporteurs calciques dont l'effet est masqué par la présence d'autres transporteurs qui participent en grande partie à l'accumulation du Cd.

8.7 Interaction Cd-Hg et Cd-Pb

Certaines professions exposent les travailleurs à des substances multiples dont les effets éventuels peuvent être additifs, synergiques ou antagonistes sans qu'il soit possible de discerner de manière précise le ou les toxique(s) impliqué(s). C'est le cas des employés travaillant dans les mines de fer ou dans des fonderies, lieux où les carcinogènes potentiels sont variés tels que retrouvés dans la fumée de différents métaux. Afin de mieux caractériser les interactions possibles entre le Pb, le Cd et le Hg, nous avons exposé les cellules A549 et H441 à divers mélanges de ces métaux. Un effet antagoniste du Pb est observé sur la toxicité du Cd ainsi qu'entre le Hg et Cd. Le Pb potentialise les effets du Hg dans les deux lignées alors qu'il semble avoir un effet antagoniste sur l'action du mélange Cd-Hg dans les cellules A549 seulement. Mentionnons toutefois le plan expérimental utilisé ne permettait pas d'évaluer une action synergique possible entre les métaux puisque ceux-ci ont été utilisés à des concentrations équivalentes à leur LC_{50} respectives. Il aurait fallu utiliser des concentrations de métaux individuels donnant moins de 50% de mortalité (ex ; 25% de mortalité ou 75% de viabilité) afin de discriminer entre des interactions de type additif ou synergique.

Les séries d'expériences visant à déterminer l'effet d'un métal sur la courbe de viabilité cellulaire en réponse à un autre métal indiquent que dans les deux lignées le Pb semble avoir un effet protecteur contre la cytotoxicité du Cd alors que le Hg sensibilise les cellules A549 et ne modifie pas les paramètres de toxicité du Cd dans la lignée H441.

Dans les deux lignées, les résultats de toxicité et d'accumulation du Cd en présence de Hg et Pb indiquent la présence d'une corrélation entre les contenus cellulaires en Cd et le potentiel toxique. Le Pb protège significativement les deux lignées contre la toxicité du Cd en inhibant le transport membranaire du Cd alors que le Hg sensibilise les cellules A549 en

augmentant les niveaux d'accumulation du Cd. En effet, certaines recherches ont démontré que le transport intestinal du Cd est inhibé par le Pb (Foulkes, 1985; Aduayom et Jumarie, 2005). L'effet protecteur qu'exerce le Pb dans les cellules A549 et H441 contre la cytotoxicité du Cd et en concordance avec nos résultats précédents qui indiquent un effet antagoniste du Pb sur la toxicité du Cd. Cela suggère soit une grande capacité du Pb à bloquer les systèmes spécifiques responsables du transport de Cd soit une compétition réciproque entre ces deux métaux sur les mêmes sites de transport cellulaire. Par ailleurs, le Hg sensibilise les cellules A549 au Cd, mais pas les cellules H441. Or, il a été démontré que le Hg est susceptible d'augmenter le volume cellulaire (Ballatori et Boyer 1996; Aduayom et Jumarie, 2005). Il est hypothétiquement possible qu'un accroissement du volume cellulaire causé par le Hg soit responsable de l'augmentation de l'accumulation de Cd observée dans les cellules A549. Nos résultats indiquent que ce phénomène ne serait pas opérant dans les cellules H441 puisque le Hg n'y modifie pas l'accumulation de Cd.

L'étude de l'effet du Pb et du Cd sur la courbe de viabilité cellulaire en réponse au Hg indique que le Pb protège les cellules H441 mais pas les cellules A549. Également, nos résultats indiquent que, dans les deux lignées, le Cd sensibilise les cellules au Hg ce qui résulte en une valeur de LC_{50} respectivement deux et trois fois plus faible dans les A549 et dans les cellules H441. Il aurait donc été intéressant de caractériser aussi le transport membranaire du Hg et du Pb radioactif en absence et en présence du Cd pour mieux évaluer si les effets de mélanges sur la viabilité cellulaire sont toujours corrélés à des variations d'accumulation cellulaire.

CHAPITRE IX

CONCLUSION

Le Cd, de Pb et de Hg font partie des métaux lourds les plus préoccupants pour la santé. Comme le poumon représente le premier organe cible des toxiques inhalés, notre projet consistait à comparer l'effet de ces métaux en ciblant deux sites différents au niveau de l'appareil respiratoire soient les cellules bronchiolaires H441 et alvéolaires A549. Nous avons, d'une part, évalué le potentiel toxique du Cd, du Pb et du Hg et avons, d'autre part, caractériser le transport membranaire du Cd.

Dans les deux lignées, les études de toxicité ont démontré que le Cd et le Hg sont cytotoxiques, alors que le Pb n'affecte pas la viabilité cellulaire. Les valeurs de LC_{50} obtenues en réponse au Hg indiquent que le potentiel de toxicité de ce métal ne varie pas d'une lignée à l'autre ($LC_{50} \approx 158 \mu M$). Toutefois, la lignée A549 semble être deux fois plus sensible au Cd que les cellules H441 et les études d'accumulation cellulaire du ^{109}Cd indiquent que la différence de cette sensibilité entre les lignées n'est pas liée à une plus grande accumulation de Cd mais serait plutôt attribuable à d'autres mécanismes de protection cellulaire tels que la présence et/ou l'induction de MTs, de GSH ou de HSP70. Il serait donc pertinent de comparer la capacité antioxydante ainsi que les niveaux d'induction de ces protéines de stress dans les cellules A549 et H441.

La caractérisation du transport membranaire du Cd indique que l'accumulation du ^{109}Cd implique un système de transport spécifique en plus de la diffusion passive. Les paramètres cinétiques de transport varient d'une lignée à l'autre et indique un système spécifique à haute affinité ($K_m < 5 \mu M$ dans les deux cas). Bien qu'aucune variation de K_m n'ait pu être observée, il semble que la spéciation du Cd modifie grandement son accumulation. En effet, le Cd est bien plus transporté en milieux inorganiques (chloré et nitré) comparativement au milieu organique (DMEM) qui contient plusieurs acides aminés capables de complexer le Cd. Il semble aussi, tel qu'observé dans des études antérieures, que

l'accumulation de Cd ne dépende pas seulement de l'ion libre; des chlorocomplexes participeraient aussi au transport membranaire. Dans les deux lignées, le transport de Cd est plus faible à pH acide mais ce phénomène est plus marqué dans les cellules A549 que dans les cellules H441. Il est donc probable qu'un système de transport médié soit plus efficace à pH 7.5 qu'à pH 5.5 dans les cellules A549. L'étude des interactions Cd-Ca montre que le Cd inhibe le transport de ^{45}Ca alors que le Ca n'inhibe pas l'accumulation de ^{109}Cd même si les cellules A549 possèdent des VDCC. Toutefois, des essais complémentaires demeurent essentiels pour mieux comprendre l'inhibition non réciproque entre le transport de Cd et de Ca.

Les études de toxicité et d'accumulation du Cd en absence et en présence de Pb, de Cd et de Hg, indiquent que le Pb protège les deux lignées contre la toxicité du Cd en inhibant le transport membranaire du Cd alors que le Hg sensibilise les cellules A549 possiblement en augmentant les niveaux d'accumulation par accroissement du volume cellulaire. Ceci ne semble pas se passer dans les cellules H441 qui possèdent peut-être des mécanismes de régulation du volume cellulaire différents et/ou plus résistants. Par ailleurs, le Cd sensibilise les cellules au Hg alors que le Pb protège les cellules H441 mais pas les cellules A549. Il serait donc intéressant de caractériser aussi le transport membranaire du Hg et du Pb radioactif en absence et en présence du Cd pour mieux élucider l'effet de mélange de métaux en terme de toxicité et de transport membranaire.

RÉFÉRENCES

- Adamson I, Frieditis H, Hedgecock C, Vincent R. 2000. Zinc Is the Toxic Factor in the Lung Response to an Atmospheric Particulate Sample. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 166 : 111 –119.
- Aduayom I, Campbell, P, Denizeau, F, Jumarie, C. 2003. Different transport mechanisms for cadmium and mercury in Caco-2 cells: inhibition of Cd uptake by Hg without evidence for reciprocal effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 189 : 56-67.
- Aduayom I, Jumarie, C. 2005. Reciprocal inhibition of Cd and Pb sulfocomplexes for uptake in Caco-2 cells. *Biochim. Mol. Toxicol.* 19 : 256 – 265.
- Akerman MA, Chan WCW, Laakkonen P, Bhatia SN, Ruoslahti E. 2002. Nanocrystal targeting in vivo. *PNAS.* 99 : 12 617-12 621.
- Alleman L. 1997. Apports des isotopes stables du plomb au suivi des traces métalliques en Méditerranée et en Atlantique Nord. Université de St Jérôme, Aix-Marseille II.
- Ando M, Shimizu M, Sayato Y, Tanimura A, Tobe M. (1981). The inhibition of vitamin D-stimulated intestinal calcium transport in rat after continuous oral administration of cadmium. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 61 : 277-301.
- Angell N, Lavery J. 1982. The relationship of blood lead levels to obstetric outcome. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 142 : 40-46.
- Aruna K, Se-Ran Y, Irfan R. 2008. Differential effects of cigarette smoke on oxidative stress and proinflammatory cytokine release in primary human airway epithelial cells and in a variety of transformed alveolar epithelial cells. *Resp. Res.* 7: 132.
- Aubier M, Fournier M, Pariente R. 1996. *Pneumologie*. Flammarion Médecine-Sciences. Paris. pp. 819-848.
- Azar A, Trochimowicz H, Maxfield M. 1973. Review of lead studies in animals carried out at Haskell Laboratory two year feeding study and response to hemorrhage study. In: Barth D, Berlin, A, Engle, R, Recht, P, Smeets, J. 1972. *Environmental Health Aspects of Lead. Proceedings of an International Symposium, Amsterdam, The Netherlands.*
- Baize D. 1997. Un point sur les teneurs totales en éléments-traces métalliques dans les sols. INRA Éditions, Paris. France. pp. 408.

Baker TK, VanVooren HB, Smith WC, Carfagna MA. 2003. Involvement of calcium channels in the sexual dimorphism of cadmium-induced hepatotoxicity. *Toxicol. Lett.* 137 : 185-192.

Ballatori N, Boyer JL. 1996. Disruption of cell volume regulation by mercuric chloride is mediated by an increase in sodium permeability and inhibition of an osmolyte channel in skate hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 140 : 404-410.

Barry P. 1978. Distribution and storage of lead in human tissues. in : *The biogeochemistry of lead in the environment.* pp. 97.

Bergeron PM, Jumarie C. 2006. Reciprocal inhibition of Cd(2+) and Ca(2+) uptake in human intestinal crypt cells for voltage-independent Zn-activated pathways. *Biochim. Biophys. Act.* 1758 : 702-712.

Berglund M, Akesson A, Nermell B, Vahter M. 1994. Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake. *Environ. Health Perspect.* 102 : 1058-1066.

Berglund M, Akesson A, Nermell B, Vahter M. 1994. Intestinal absorption of dietary cadmium in women depends on body iron stores and fiber intake, *Environ. Health. Persp.* 102 : 1058-1066.

Berkefeld H, Sailer CA, Bildl W, Rohde V, Thumfart JO, Eble S, Klugbauer N, Reisinger E, Bischofberger J, Oliver D, Knaus HG, Schulte J, Fakler B. BKCa-Cav channel complexes mediate rapid and localized Ca²⁺-activated K⁺ signaling. *Science.* 314 : 615-620.

Berkefeld H, Sailer CA. 2006. BKCa-Cav Channel Complexes Mediate Rapid and Localized, Ca²⁺-activated K⁺ Signaling. *Science.* 314 : 615-620.

Berlin M, Jerksell L, von Ubisch H. 1966. Uptake and retention of mercury in the mouse brain. A comparison of exposure to mercury vapor and intravenous injection of mercuric salt. *Arch. Environ. Health.* 12 : 33-42.

Bernard A, Amor A, Lauwerys R. 1988. Decrease of erythrocyte and glomerular membrane negative charges in chronic cadmium poisoning. *Br. J. Ind. Med.* 45 : 112-115.

Beton D, Andrews G, Davies H, Howells L, Smith G. 1966. Acute cadmium fume poisoning. Five cases with one death from renal necrosis, *Brit. J. Ind. Med.* 23 : 292-301.

Blazka ME, Shaikh ZA. 1992. Cadmium and mercury accumulation in rat hepatocytes : interactions with other metal ions. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 113 : 118-125.

Bliefert C, Perraud R. 2004. *Chimie de l'environnement: Air, eau, sols, déchets.* Boeck Université. pp. 373-374.

Blum WE. 1990. Pollution des sols par métaux lourds. Sixième conférence ministérielle européenne sur l'environnement. Bruxelles.

Boeckx R. 1986. Lead poisoning in children. *Anal. Chem.* 58 : 275-285.

Bogden J, Oleske J, Louria D. 1997. Lead poisoning one approach to a problem that won't go away. *Environ. Health. Perspect.* 105 : 1284-1287.

Bonnell J.A. 1955. Emphysema and proteinuria in men casting copper-cadmium alloys. *Br. J. Ind. Med.* 12 : 181-187.

Borowitz L, McLaughlin J. (1992). Evidence for calcium channels in brine shrimp: Diltiazem protects shrimp against cadmium. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 48 : 435-440.

Bradbury M, Deane R. 1993. Permeability of the blood-brain barrier to lead. *Neurotoxicol.* 4: 131-136.

Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72 : 248-54.

Byrd JC, Shapiro RS, Schiedermayer DL. 1989. Passive smoking : a review of medical and legal issues. *Am. J.* 79 : 209-215.

Carpenter D, Arcaro K, Spink D. 2002. Understanding the human health effects of chemical mixtures. *Environ. Health. Perspect.* 110 : 25-42.

Cercy SP, Wankmuller MM. 2008. Cognitive dysfunction associated with elemental mercury ingestion and inhalation: a case study. *Appl. Neuropsychol.* 15 : 79-91.

Chambers R, McNulty R, Shock A, Campa J, Newman A Taylor G, Laurent J. 1994. Cadmium selectively inhibits fibroblast procollagen production and proliferation. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 267: 300-308.

Chen H, Davidson T, Singleton S, Garrick MD. 2005. Costa M Nickel decreases cellular iron level and converts cytosolic aconitase to iron regulated protein 1. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 206 : 275-287.

CIRC : Centre International de Recherche sur le Cancer. 2006. Évaluation des risques de cancérogénicité pour l'Homme. Dérivés inorganiques et organiques du plomb. 87 : 5-12.

Cohen MD, Yang Z, Zelikoff JT. 1994. Immunotoxicity of particulate lead: in vitro exposure alters pulmonary macrophage tumor necrosis factor production and activity. *J. Toxicol. Environ. Health.* 42 : 377-392.

- Croute F, Beau B, Arrabit C, Gaubin Y, Delmas Y, Murat J, Soleilhavoup J. 2000. Pattern of stress protein expression in human lung cell-line A549 after short- or long-term exposure to cadmium. *Environ. Health Perspect.* 108 : 55-60.
- Danielsen PH, Loft S, Moller P. 2008. DNA damage and cytotoxicity in type II lung epithelial (A549) cell cultures after exposure to diesel exhaust and urban street particles. Part. *Fibre. Toxicol.* 8 : 5-6.
- Decker L, Byerrum R, Decker C, Hoppert C, Langham F. 1958. Chronic toxicity studies. Cadmium administered in drinking water to rats. *Arch. Ind. Health.* 18: 228-231.
- Donaldson K, Stone V, Clouter A, Renwick L, MacNee W. 2001. Ultrafine particles. *Occup. Environ. Med.* 58 : 285-305.
- Elder A, Oberdorster G. 2006. Translocation and effect of ultrafine particles outside the lung. *Clin. Occup. Environ. Med.* 5 : 785-796.
- Elisma F, Jumarie C. 2001. Evidence for cadmium uptake through Nramp2 : Metal speciation studies with Caco-2 Cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285 : 662-668.
- Environnement Canada. 1976. National inventory of sources and emissions of cadmium. Rapport APCD 76-2, Direction générale de lutte contre la pollution de l'air, Ottawa.
- Feillet M, Feillet P. 2002. Le bon vivant- une alimentation sans peur et sans reproche. pp.260.
- Fernandez A, Sanz P, Palomar M, Serra J, Gadea E. 1996. Fatal chemical pneumonitis due to cadmium fumes. *Occ. Med.* 46 : 372-374.
- Flanagan PR, McLellan J, Haist J, Cherian MG, Chamberlain MJ, Valbar LS. 1978. Increased dietary cadmium absorption in mice and human subjects with iron deficiency. *Gastroenterology.* 74: 841-846 .
- Fleischer M, Sarofim A, Fassett D, Hammond P, Shacklette H. 1974. Environmental impact of cadmium: a review by the panel on hazardous trace substances. *Environ. Health. Perspect.* 7 : 253-323.
- Florkin M. 1956. Aspects biochimiques communs aux êtres vivants: introduction à la biochimie générale des organismes. Marcel Florkin. Masson, Paris pp.141.
- Foa V, Caimi L, Amante L, Antonini C, Gattinoni A, Tettamanti G, Lombardo A, Giuliani A. 1976. Patterns of some lysosomal enzymes in plasma and of proteins in urine of workers exposed to inorganic mercury. *Occup. Environ. Health.* 37 : 115-124.
- Forbes VE, Forbes TL, Rivière JL. 1997. Ecotoxicologie-théorie et applications. pp.197.

Fortoul TI, Saldivar OL, Espejel-Maya G, Bazarro NP, Mussali-Galante P, Avila-Casado MC, Colin-Barenque L, Avila-Costa MR. 2005. Inhalation of cadmium, lead or its mixture: Effects on the bronchiolar structure and its relation with metal tissue concentrations. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19 : 329-334.

Foster KA, Oster CG, Mayer MM, Avery ML, Audus KL. 1998. Characterization of the A549 cell line as a type II pulmonary epithelial cell model for drug metabolism, *Experiment. Cell. Res.* 243 : 359-366.

Foulkes EC. 1985. Interactions between metals in rat jejunum : implications on the nature of cadmium uptake. *Toxicol.* 37 : 117-125.

Friberg L, Piscator M, Nordberg G, Kjellstrom T. 1984. Cadmium in the environment.. CRC. Press. p. 94.

Friberg L, Vostal J. 1972. Mercury in the environment.. CRC Press, Cleveland, OH. pp. 15.

Gaultier M, Fournier E, Gervais P, Morel-Maroger L, Bismuth C, Rain JD. 1968. Deux cas de syndrome néphrotique dans une fabrique de thermomètres. *Bull.Mem.Soc.Med.* 119 : 47-61.

Godowicz B, Godowicz W. 1990. Effect of cadmium on thickness of compact bone and on bone repair in cadmium-sensitive mice. *Folia. Biol.* 38 : 63-66.

Godwin H. 2001. Synaptotagmin I is a Molecular Target for Lead. *Curr.Opin. Chem. Biol.* 5 : 223-227.

Gombert S. 2005. Pollution atmosphérique par les métaux. EDP Sciences Editions. pp. 10.

Goyer R. 1991. Toxic effects of metals in : Casarett and Doull's toxicology. Amdur M, Doull J, Klaassen C. Pergamon Press, Toronto, Canada. pp.623-680.

Grandjean P. 1975. Lead concentration in single hairs as a monitor of occupational lead exposure. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 42 : 69- 81.

Greenwood N, Earnshaw A. 1984. Chemistry of the elements. Pergamon Press, Oxford. pp. 248.

Gregus Z, Stein AF, Varga F, Klassen CD. 1992. Effect of lipoic acid on biliary excretion of glutathione and metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 114 : 88-96.

Gunshin S, Mackenzie B, Berger UV, Gunshin Y, Romero MF, Boron WF, Nussberger S, Gollan JL, Hediger MA. 1997. *Nature.* 388, 482-488.

- Gutknecht J. 1981. Inorganic mercury transport through lipid bilayer membranes. *J. Memb. Biol.* 61:61-66.
- Hallenbeck WH. 1984. Human health effects of exposure to cadmium. *Experientia.* 40: 136-142.
- Hamilton DL, Smith MW. 1978. Inhibition of intestinal calcium uptake by cadmium and the effect of a low calcium diet on cadmium retention. *Environ. Res.* 15 : 175–184.
- Hammer D, Calocci A, Hasselblad V, Williams M, Pinkerson C. 1973. Cadmium and lead in autopsy tissues. *J. Occup. Med.* 15 : 956-963.
- Hatcher E, Chen Y, Kang Y. 1995. Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free. Rad. Biol. Med.* 19 : 805-812.
- Hatcher E, Chen Y, Kang Y. 1995. Cadmium resistance in A549 cells correlates with elevated glutathione content but not antioxidant enzymatic activities. *Free. Rad. Biol. Med.* 19 : 805-812.
- Heilig E, Thompson K, Molina R, Ivanov A, Brain J, Wessling M. 2006. Manganese and iron transport across pulmonary epithelium. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 290 : 1247-1259.
- Hinkle P, Kinsella P, Osterhoudt K. 1987. Cadmium uptake and toxicity via voltage-sensitive calcium channels. *J. Biol. Chem.* 262 : 16333–16337.
- Hoffmann W, Bergmann R. 1998. Predictions of particles deposition patterns in human and rats airways. *Inh. Toxicol.* 10 : 557-583.
- Huchon G. 2001. *Pneumologie.* Paris. Masson. pp. 7-8.
- IARC : International Agency for Research on Cancer. 1987. *Monographs on Lead and Lead Compounds, Inorganic,* IARC, Lyon. 23 : 7.
- IARC : Centre international de recherche sur le cancer. 1982. *Chemicals, industrial processes and industries associated with cancer in humans.* Eval. Carcinog. Risk. Chem. Hum. Suppl. 4: 149.
- Jaques A. 1982. *Inventaire des sources et des rejets de plomb. Rapport n° SPE 5/HA/3,* Service de la protection de l'environnement, Environnement Canada, Ottawa.
- Jovanovi S, Crawford RM, Ranki HJ, Jovanovi A. 2003. Large Conductance Ca^{2+} -Activated K^{+} Channels Sense Acute Changes in Oxygen Tension in Alveolar Epithelial Cells. *American. J. Resp. Cell. Mol. Biol.* 28 : 363-372.

- Jumarie C, Campbell P, Berteloot A, Houde M, Denizeau F. 1997. Caco-2 cell line used as in vitro model to study cadmium accumulation in intestinal epithelial cells. *J. Membr. Biol.* 158 : 31-48.
- Jumarie C, Fortin C, Houde M, Campbell PGC, Denizeau F. 2001. Cadmium uptake by Caco-2 cells: effects of complexation by chloride, glutathione and phytochelatins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 170 : 29-38.
- Jumarie C. 2002. Cadmium transport through type II alveolar cell monolayers: contribution of transcellular and paracellular pathways in the rat A772 and the human A549 cells. *Biochim. Biophys. Acta.* 1564 : 487-499.
- Kang HK, Infante PR, Carra JS. 1980. Occupational lead exposure and cancer. *Science.* 20 : 935-936.
- Kang Y, Enger M. 1990. Glutathione content and growth in A549 human lung carcinoma cells. *Exp. Cell. Res.* 187 : 177-179.
- Kitamura M, Sumiro K, Kamatanni N. 1970. Cadmium concentrations in livers, kidneys and bones of human bodies. *Jpn. J. Public. Health.* 17: 507.
- Kitman JL, Pouillot A. (2005). *L'histoire secrète du plomb*. Ed. Allia. Paris. pp. 7
- Klaassen CD, Liu J, Choudhuri S. 1999. Metallothionein: an intracellular protein to protect against cadmium toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 39 : 267-94.
- Kobayashi N, Okamoto T. 1974. Effects of lead oxide on the induction of lung tumors in Syrian hamster. *J. Natl. Cancer Inst.* 52 : 1605-1610.
- Kodavanti U, Hauser R, Christiani D, Meng Z, McGee J, Ledbetter A, Richards J, Costa D. 1998. Pulmonary responses to Oil fly ash particles in the rat differ by virtue of their specific soluble metals. *Toxicol. Sci.* 43 : 204-212.
- Kojima S, Kiyozumi M, Mishima M, Honda T, Nakagawa M. 1985. Effects of three proteins on absorption of cadmium in rats. *Toxicol.* 34 : 161-171.
- Koller L, Kerkvliet N, Exon J. 1986. Neoplasia induced in male rats fed lead acetate, ethyl urea and sodium nitrate. *Toxicol. Pathol.* 13 : 50-57.
- Kusakabe T, Nakajima K, Nakazato K, Suzuki K, Takada H, Satoh T, Oikawa M, Arakawa K, Nagamine T. 2008. Changes of heavy metal, metallothionein and heat shock proteins in Sertoli cells induced by cadmium exposure. *Toxicol. In Vitro.* 22 : 1469-1475.
- Lauwerys R. 1999. *Toxicologie industrielle et intoxications professionnelles*. pp.16.

Lazrak A, Samanta A, Matalon S. 2000. Biophysical properties and molecular characterization of amiloride-sensitive sodium channels in A549 cells. *Physiol.* 278 : 848-857.

Leduc D, Francquen P, Jacobovitz D, Vandeweyer R, Lauwerys R, De Vuyst P. 1993. Association of cadmium exposure with rapidly progressive emphysema in a smoker. *J. Thor.* 48 : 570-571.

Leland H, Kuwabara J. 1985. Trace Metals. In : fundamentals of aquatic toxicology. Hemis. Pub. Corp. pp.374-415.

Lévesque M, Martineau C, Jumarie C, Moreau R. 2008. Characterization of cadmium uptake and cytotoxicity in human osteoblast-like MG-63 cells. *Toxicol. App. Pharmacol.* 231 : 308-317.

Lewis G, Jusko W, Coughlin L. 1972. Cadmium accumulation : influence of smoking, occupation, alcoholic habit and disease. *J. Chronic. Dis.* 25 : 717-726.

Lewis G, Lyle H, Miller S. 1969. Association between elevated hepatic water -soluble protein-bound cadmium levels and chronic bronchitis and-or emphysema. *Lancet.* 20 : 1330-1333.

Lieber M, Smith B, Szakal A, Nelson-Rees W, Todaro G. 1976. A continuous tumor-cell line from a human lung carcinoma with properties of type II alveolar epithelial cells, *Intern. J. Canc.* 17 : 62-70.

Lin CJ, Wu KH, Yem FH, Lee TC. 1995. Differential cytotoxicity of cadmium to rat embryonic fibroblasts and human skin fibroblasts. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 133 : 20-26.

Luckey TD, Venugopal B. 1977. Metal toxicity in mammals. Physiologic and chemical basis for metal toxicity, Part I. Plenum Press, New York, USA.

Lymburner D. 1974. Environmental contaminants inventory study No. 2. The production use and distribution of cadmium in Canada. Report Series No. 39, Centre canadien des eaux intérieures, Direction des eaux intérieures, Ottawa.

Mairbäurl H, Wodopia R, Eckes S, Schulz S, Bartsch P. 1997. Impairment of cation transport in A549 cells and rat alveolar epithelial cells by hypoxia. *Am. J. Physiol.* 273 : 797-806.

Marcus WL. Lead health effects in drinking water. 1986. *Toxicol. Ind. Health.* 2 : 363-407.

Martinet Y, Anthoine D. 1999. Les maladies respiratoires d'origine professionnelle. pp.57.

Mikalsen S. 1990. Effects of heavy metal ions on intercellular communication in Syrian hamster embryo cells. *Carcino.* 11 : 1621-1626.

Milne J, Christophers A, de Silva P. 1970. Acute mercurial pneumonitis. *Brit.J.industr.Med.* 27 : 334-338.

Miquel G. 2001. Office Parlementaire d'Evaluation des Choix Scientifiques et Technologiques – Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. pp. 230-280.

Mishima A, Kaji T, Yamamoto C, Sakamoto M, Kozuka H. 1995. Zinc-induced tolerance to cadmium cytotoxicity without metallothionein induction in cultured bovine aortic endothelial cells. *Toxicol. Letters.* 75 : 85-92.

Moberg W. 1993. The effects of whole wheat, wheat bran and zinc in the diets on the absorption and accumulation of cadmium in rats. *Br. J. Nutr.* 69 : 199-209.

Monn C, Becker S. 1999. Cytotoxicity and Induction of Proinflammatory Cytokines from Human Monocytes Exposed to Fine (PM_{2.5}) and Coarse Particles (PM_{10-2.5}) in Outdoor and Indoor Air. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 155 : 245-252.

Moore M, Meredith P, Watson W, Sumner D, Taylor M, Goldberg A. 1980. The percutaneous absorption of lead-203 in humans from cosmetic preparations containing lead acetate, as assessed by whole-body counting and other techniques. *Food. Cosm. Toxicol.* 18 : 399-405.

Moore R, Campbell B, Goldberg A. 1977. *The Chemical Environment.* Academic Press. New York. 6 : 64.

Morel F. 1983. *Principles of aquatic chemistry.* Wiley-Interscience. New-York. pp. 301.

Munger C, Hare L. 1997. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect : Implication for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environ. Sci.Technol.* 31 : 891-895.

Mushak P, Crocetti A. 1998. Methods for reducing lead exposure in young children and other risk groups. pp. 125-135.

Nandi M, Jick H, Slone D, Shapiro S, Lewis G.P. 1969. Cadmium content of cigarettes. *Lancet.* 2 : 1329-1330.

Nemmar A, Hoet PH, Vanquickenborne B, Dinsdale D, Thomeer M, Hoylaerts MF, Vanbilloen H, Mortelmans L, Nemery B. 2002. Passage of inhaled particles into the blood circulation in humans. *Circulation.* 105 : 411-414.

Nilsson U, SchuKtz A, Skerfving S, Mattsson S. 1995. Cadmium in kidneys in Swedes measured in vivo using X-ray fluorescence analysis. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 67 : 405-411.

Nordberg G, Serenius F. 1969. Distribution of inorganic mercury in the guinea pig brain. *Acta.Pharmacol.Toxicol.* 27 : 269–283.

Nordberg G. (1974). Health Hazards of Environmental. *Ambio.* 3 : 55 –66.

O.M.S : Organisation mondiale de la santé. 1974. Environmental health criteria for cadmium.

Obersdörster G. 1992. Pulmonary deposition, clearance and effects of inhaled and insoluble cadmium compounds. *IARC. Sci. Publ.* 118 :189-204.

Olabarrieta I, L'Azou B, Yuric S, Cambar J, Cajaraville MP. 2001. In vitro effects of cadmium on two different animal cell models. *Toxicol. In. Vitro.* 15 : 511-607.

O'Reilly MA, Weaver T, Pilot T, Satin V, Gazdar A, Whitsett J. 1989. In vitro translation, post-translational processing and secretion of pulmonary surfactant protein B precursors. *Biochim. Biophys.* 1011 : 140-148.

Palkovicova L, Ursinyova M, Masanova V, Yu Z, Hertz-Picciotto I. 2008. Maternal amalgam dental fillings as the source of mercury exposure in developing fetus and newborn. *J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol.* 18 : 326-331.

Pappas G, Polzin L, Zhang C, Watson D, Paschal C, Ashley D. 2007. Cadmium, lead, and thallium in smoke particulate from counterfeit cigarettes compared to authentic US brands. *Food. Chem. Toxicol.* 45 : 202-209.

Park EK, Mak SK, Kültz D, Hammock BD. 2007. Evaluation of cytotoxicity attributed to thimerosal on murine and human kidney cells. : *J. Toxicol. Environ. Health. A.* 70 : 2092-2095.

Pasha Shaik A, Sankar S, Reddy SC, Das PG, Jamil K. 2006. Lead-induced genotoxicity in lymphocytes from peripheral blood samples of humans: in vitro studies. *Drug. Chem. Toxicol.* 29 : 111-124.

Perriot J, Liorca P. 2003. *Tabacologie et sevrage tabagique.* pp. 173-176.

Pichard A. 2000. Fiches de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques: zinc. INERIS : Institut National de l'environnement industriel et des risques. France.

Pigman E, Blanchard J, Laird E. 1997. A study of cadmium transport pathways using de Caco-2 cell model. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 142 : 243-247.

Pohl HR, Roney N, Wilbur S, Hansen H, De Rosa CT. 2003. Six interaction profiles for simple mixtures. *Chemosphere.* 53 : 183-197.

- Poirier L, Theiss J, Arnold L, Shinkin M. 1984. Inhibition by magnesium and calcium acetate of lead subacetate- and nickel acetate-induced lung tumors in strain A mice. *Can. Res.* 44 : 1520-1522.
- Prati M, Gornati R, Boracchi P, Biganzoli E, Fortaner S, Pietra R, Sabbioni E, Bernardini G. 2002. A comparative study of the toxicity of mercury dichloride and methylmercury, assayed by the Frog Embryo Teratogenesis Assay--Xenopus (FETAX). *Altern. Lab. Anim.* 30 : 23-32.
- Pyrgiotakis G, Bhowmick TK, Finton K, Suresh AK, Kane SG, Bellare JR, Moudgil BM. 2008. Cell (A549)-particle (Jasada Bhasma) interactions using Raman spectroscopy. *Biopolymers.* 89 : 555-564.
- Quinn M.J, Sherlock J.C. 1990. The correspondence between U.K. action levels for lead in blood and in water. *Food. Addit. Contam.* 7 : 387-424.
- R Lilis, A Miller and Y Lerman. 1985. Acute mercury poisoning with severe chronic pulmonary manifestations. *Chest* . 88 : 306-309.
- Rabinowitz M, Wetherill G, Kopple J. 1976. Kinetic analysis of lead metabolism in healthy humans. *J. Clin. Invest.* 58 : 260-270.
- Rahola T, Aaran R, Miettinen J. 1971. Half-time studies on mercury and cadmium by whole-body counting. In *Assessment of Radioactive Contamination in Man. Inter. Atom. Ener. Agen.* 13 : 553-562.
- Roels H, Buchet J, Truc J, Croquet F., Lauwerys R. 1982. The possible rôle of direct ingestion on the overall absorption of cadmium or arsenic in workers exposed to CdO or As₂O₃ dust. *Am. J. Ind. Med.* 3 : 53-65.
- Roesijadi G. 1994. Metallothionin induction as a mesure of response to metal exposure in aquatic animals. *Environ. Health. Perspect.* 102 : 91-95.
- Salnikow K, Blagosklonny M, Heather R, Randall J, Costa M. 2000. Carcinogenic Nickel Induces Genes Involved with Hypoxic Stress. *Canc. Res.* 60: 38-41.
- Sarkar B. 2002. Heavy metals in the environment. pp. 231-234/457-458.
- Schechter E. 1990. *Biochimie et Biophysique des Membranes.* pp. 127.
- Schiønning J, Eide R, Møller-Madsen B, Ernst E. 1993. Detection of mercury in rat spinal cord and dorsal root ganglia after exposure to low-level mercury vapor. *Exp. Mol. Pathol.* 58 : 215-228.

Schmid M, Zimmermann S, Krug HF, Sures B. 2007. Influence of platinum, palladium and rhodium as compared with cadmium, nickel and chromium on cell viability and oxidative stress in human bronchial epithelial cells. *Environ. Int.* 33 : 385-390.

Sener G, Sehirli O, Tozan A, Velioglu-Ovunç A, Gedik N, Omurtag GZ. 2007. Ginkgo biloba extract protects against mercury(II)-induced oxidative tissue damage in rats. *Food. Chem. Toxicol.* 45 : 543-550.

Simon O. (2000). Étude des voies de contamination-directe et trophique-des organismes aquatiques continentaux par les métaux- mercure, cadmium, zinc- Approches expérimentales au laboratoire et in situ. Université Bordeaux 1. pp. 171.

Smith B. 1977. Cell line A549: A model system for the study of alveolar type II cell function. *Am. Rev. Respir. Dis.* 115 : 285-293.

Snider G, Hayes J, Korthy A, Lewis G. 1973. Centrilobular emphysema experimentally induced by cadmium chloride aerosol. *Am. Rev. Respir. Dis.* 108 : 40-48.

Sorokin. 1970. The cells of the lung. In: morphology of experimental Respiratory Carcinogenesis. P.Nettesheim. *AEC.* 21 : 3-44.

Sorrell M, Rosen JF, Roginsky MR. 1977. Interactions of lead, calcium, vitamin D and nutrition in lead-burdened children. *Arch. Environ. Health.* 32 : 160-164.

Stephen D, Bresnick. 2004. *Biologie.* pp.183-184.

Stevens A, Steven JL. 1991. *Histologie.* pp. 134-135.

Stipp S, Hochella M, Parks G, Leckie J. 1992. Cd²⁺ uptake by calcite, solid-state diffusion, and the formation of solid-solution: Interface processes observed with nearsurface sensitive techniques. *Geochim. Cosmochim.* 56: 1941-1954.

Sundelin B. 1984. Single and combined effects of lead and cadmium on *Pontoporeia affinis* (Crustacea, Amphipoda) in laboratory soft-bottom microcosms. In: *Ecotoxicological Testing for the Marine Environment*, 2nd vol. Persoone G, Jaspers E, Claus C. pp.237-58.

Takenaka S, Oldiges H, König H, Hochrainer D, Oberdörster G. 1993. Carcinogenicity of cadmium chloride aerosols in Wistar rats. *J. Nat. Canc. Inst.* 70 : 367-371.

Thomas V, Bouchez T, Nicolas V, Robert S, Loret JF, Lévi Y. 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence. *J. App. Microbio.* 97 : 950-963

Todd A, Wetmur J, Moline J, Godbold J, Levin S., Landrigan P. 1996. Unraveling the chronic toxicity of lead: an essential priority for environmental health. *Environ. Health. Perspect.* 104 : 141–146.

Urani C, Melchiorretto P, Canevali C, Morazzoni F, Gribaldo L. 2007. Metallothionein and hsp70 expression in HepG2 cells after prolonged cadmium exposure. *Toxicol. In Vitro.* 21 : 314-319.

USEPA : United States Environmental Protection Agency. 1986. Air quality criteria for lead. Research Triangle Park, North Carolina, Office of Research and Development, Office of Health and Environmental Assessment. Environmental Criteria and Assessment. Report No. EPA 600/8-83-028F.

Valbonesi P, Ricci L, Franzellitti S, Biondi C, Fabbri E. 2008. Effects of cadmium on MAPK signalling pathways and HSP70 expression in a human trophoblast cell line. *Placenta.* 29 : 725-33.

Valenti TW, Cherry DS, Neves RJ, Schmerfeld J. 2005. Acute and chronic toxicity of mercury to early life stages of the rainbow mussel, *Villosa iris* (Bivalvia: Unionidae). *Environ. Toxicol. Chem.* 24 : 1242-1246.

Van Cappellen P, Charlet L, Stumm W, Wersin P. 1993. A surface complexation model of the carbonate mineral-aqueous solution interface. *Geochim. Cosmochim.* 57 : 3505-3518.

W.H.O : World Health Organisation. 1976. Environmental Health Criteria. I. Mercury. Geneva. Switzerland.

Waalkes M, Diwan B, Ward J, Devor D, Goyer R. 1995. Renal tubular tumors and atypical hyperplasias in B6C3F1 mice exposed to lead acetate during gestation and lactation occur with minimal chronic nephropathy. *Cancer.Res.* 55 : 5265–5271.

Wallace WG, et Lopez GR. 1997. Bioavailability of biologically sequestered cadmium and the implications of metal detoxification. *Mar. Ecol. Prog.* 147: 149-157.

Walter P, Martinetto G, Tsoucaris R, Breniaux M, Lefebvre A, Richard G, Talabot J, Dooryhee E. 1999. Making make-up in Ancient Egypt. *Nature.* 397 : 483-484.

Wittmers L, Aufderheide A, Rapp G, Alich A. 2002. Archaeological contributions of skeletal lead analysis. *Acc. Chem. Res.* 35 : 669.